



Determinantes genéticos de virulência e de resistência aos
antibióticos em isolados uropatogénicos de *Escherichia coli*
provenientes da comunidade e do hospital.

ANA SOFIA SANCHO EUSÉBIO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

OUTUBRO DE 2015



Determinantes genéticos de virulência e de resistência aos
antibióticos em isolados uropatogénicos de *Escherichia coli*
provenientes da comunidade e do hospital.

Ana Sofia Sancho Eusébio

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Médica

Dissertação orientada pelos Professores Doutores

Aida Duarte (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa - Orientadora)

Miguel Viveiros (Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Elo de ligação à UNL)

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Outubro de 2015

Trabalhos realizados com base nesta dissertação:

a aguardar publicação:

Eusébio A, C. Araújo, M. Andrade, A. Duarte; (2015) *Escherichia coli nas infeções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica*, Acta Urológica.

Comunicações em painel:

Escherichia coli uropatogénica da comunidade: comensal ou patogénica/

Eusébio A., C. Araújo, M. Andrade, J. Oliveira, A. Duarte

Congresso Nacional dos Farmacêuticos 2015, Lisboa

Agradecimentos

À Professora Aida, pois já não sei como agradecer todo o apoio que sempre me deu, disponibilidade e as oportunidades que me facultou, sendo a mais importante a de trabalhar e aprender na sua companhia.

Aos meus pais, Sara e restante família, que tudo me deram.

À Ana Rita Sancho, Marta Gomes, Sofia Coelho, Liliana Pedro, Joana Pinto e Suzana Greene.

À equipa do laboratório 125, principalmente à Catarina Araújo e Madalena Andrade, pela amizade, alegria e ajuda.

À Farmácia Sacoór do Chiado.

Resumo

As infecções urinárias estão entre as infecções mais prevalentes sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico mais frequente.

Este estudo teve como objetivo verificar a existência ou não de correlação entre a resistência aos antibióticos e a virulência dos isolados na comunidade e em meio hospitalar.

Foram estudados 250 estirpes de *E. coli* de uroculturas de mulheres com idade ≤ 59 anos, provenientes de vários laboratórios da comunidade e 50 estirpes de *E. coli* de uroculturas relacionadas com internamento hospitalar.

Foi realizado o estudo de suscetibilidade aos antibióticos assim como a pesquisa dos genes de virulência *fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* e *cnf1*, das ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}, e a determinação do grupo filogenético, pela técnica de PCR. Abordou-se a relação entre estirpes através de métodos genotípicos como M13-PCR *fingerprinting* e MLST e finalmente estudou-se a prevalência do clone O25b-ST131 relacionado com a disseminação de ESBL do tipo CTX-M-15.

Os genes mais frequentemente isolados foram o *ecpA*, seguido de *fimH* e os grupos filogenéticos mais prevalentes foram os patogênicos B2 e D, tanto nas ITU da mulher aparentemente sem fatores de risco na comunidade como nas ITU hospitalares.

O grupo B2 mostrou-se relacionado com as citotoxinas α -hemolisina, CNF e ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}, ferramentas importantes na virulência dos isolados, verificando-se virulência associada a estirpes sensíveis aos antibióticos normalmente recomendados em terapêutica empírica.

Quanto ao clone O25b-ST131, verificou-se que a sua não associação a ESBL do tipo CTX-M foi significativa nos isolados da comunidade, enquanto que associado a CTX-M-15 se verificou disseminado a nível nacional, em ambos os isolados do meio hospitalar e comunitário, confirmando a emergência pandémica deste clone.

Abstract

Urinary infections are among the most prevalent infections and *Escherichia coli* is the most common etiologic agent.

The aim of this study was to verify the existence of correlation between antibiotic resistance and virulence in isolates related to community-acquired UTIs and hospital-acquired UTIs.

250 isolates of *E. coli* causing cystitis were studied from women under the age of 60, as the strains were sent from Portuguese clinical laboratories in the community, plus 50 uropathogenic *E. coli* related to hospitalization.

The antibiotic susceptibility of bacterial isolates was performed as well as the research of virulence genes *fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* and *cnf1*, the pathogenicity islands PAI I_{CFT073} and PAI II_{CFT073}, and the phylogenetic group determination, all by PCR. The relationship between strains was made by genotypic methods such as M13-PCR fingerprinting and MLST, and finally was studied the prevalence of O25b-ST131 clone associated with the spreading of ESBL CTX-M-15.

The most frequently isolated genes were the *ecpA*, followed by *fimH* and the most prevalent phylogenetic groups were pathogenic B2 and D, both in hospital UTI and also in UTI of women with apparently no risk factors in the community.

B2 group was related to both α -hemolysin and CNF cytotoxins, and pathogenicity islands PAI I_{CFT073} and PAI II_{CFT073}, which are important virulence tools. It was also verified virulence associated to strains sensitive to the antibiotic normally recommended in empirical therapy.

As for O25b-ST131 clone, it was found that its non-association with ESBL CTX-M type was significant in community isolates, while associated with CTX-M-15 was found spread in all country, in both hospital isolated and community isolates, confirming the emergence of this pandemic clone.

Índice

Trabalhos realizados com base nesta dissertação:	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	viii
1. Introdução	1
1.1. Fatores de virulência e filogenia.....	18
1.2. Resistência aos antibióticos.....	4
1.3. Caracterização genotípica	7
1.4. Objetivo.....	8
2. Materiais e Métodos	9
2.1. Estirpes bacterianas	9
2.2. Determinação da suscetibilidade aos antibióticos	9
2.3. Métodos Moleculares.....	10
2.3.1. Pesquisa de genes de virulência e identificação dos grupos filogenéticos ...	10
2.3.2. Pesquisa de Beta-lactamases de espectro alargado.....	11
2.3.3. Tipificação dos isolados bacterianos	12
2.3.3.1. M13-PCR <i>fingerprinting</i>	12
2.3.4. MLST	12
2.3.5. Determinação do clone O25b-ST131	29
2.4. Análise estatística	30
3. Resultados.....	31
3.1. Amostras da comunidade	31
3.1.1. Caracterização da amostra clínica	31
3.1.2. Genes de virulência	31
3.1.3. Relação dos fatores de virulência e os grupos filogenéticos	32
3.1.4. Relação das ilhas de patogenicidade com os grupos filogenéticos.....	35
3.1.5. Suscetibilidade aos antibióticos, filogenia e virulência.....	20

3.1.6. MLST	22
3.2. Amostras hospitalares	40
3.2.1. Caracterização da amostra clínica	40
3.2.2. Genes de virulência	40
3.2.3. Relação dos fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e os grupos filogenéticos	41
3.2.4. Ilhas de Patogenicidade e grupos filogenéticos	42
3.2.5. Suscetibilidade aos Antibióticos	42
3.2.6. Caracterização dos isolados produtores de beta-lactamases.....	44
3.3. M13-PCR <i>fingerprinting</i>	30
3.4. Detecção do clone O25b-ST131	30
4. Discussão e Conclusões.....	32
5. Referências Bibliográficas.....	39
6. Anexo I.....	47

Índice de siglas

ABE – água bidestilada estéril
AMC - amoxicilina/ácido clavulânico
AMX – amoxicilina
bla – beta-lactamase
CAZ - Ceftazidima
CIP - Ciprofloxacina
cITU – infecção complicada do trato urinário
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CNF1 - *cytotoxic necrotizing factor*
CTX – Cefotaxima
CTX – M – capacidade de hidrolisar Cefotaxima
CXM – Cefuroxima
DNA – ácido desoxirribonucleico
ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*
ECP - *E. coli common pilus*
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
ESBL – beta-lactamase de espectro alargado
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigénica
EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FOS – Fosfomicina
FOX – Cefoxitina
GMN – Gentamicina
IPM - Imipenem
ITU – Infecção do trato urinário
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase
MLST – *Multi Locus Sequence Typing*
ncITU - infecção do trato urinário não complicada
NT - Nitrofurantoína
PAI - Ilhas de Patogenicidade
PAP – *Pyelonephritis associated pili*
pb – pares de bases

PCR – *polymerase chain reaction*

PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis*

RNA – ácido ribonucleico

SHV - *sulfhydryl variable*

ST – *Sequence Type*

SXT - Trimetoprim-sulfametoxazol

TEM – Temoneira

UFC – unidades formadoras de colónias

UPEC – *Escherichia coli* uropatogénica

USP - *uropathogenic-specific protein*

Índice de figuras

Figura I – Patogénese da infeção do trato urinário ^[5]	17
Figura II - Percentagem de isolados de <i>Escherichia coli</i> , provenientes de cistites não complicadas e cistites complicadas, contendo os genes de virulência estudados <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> , e as ilhas de patogenicidade PAI I _{CTF073} e PAI II _{CTF073}	16
Figura III - Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> , provenientes de cistites não complicadas (A) e cistites complicadas (B), pelos grupos filogenéticos comensais (A e B1) e patogénicos (B2 e D). (C) Determinação do grupo filogenético através das combinações dos genes <i>chuA</i> (279 pb), <i>yjaA</i> (211 pb) e do fragmento de DNA TspE4C2.1 (152 pb). Poços 2, 5, 6, 8 e 10 – grupo B2; poços 3, 4 e 11 – grupo D; poço 7 – grupo A; poço 1 – grupo B1; poço 9 – indeterminado; M – marcador de peso molecular NZDNA Ladder V (Nzytech).....	17
Figura IV - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), AMX (amoxicilina), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol), CIP (ciprofloxacina), CXM (cefuroxima), NT (nitrofurantoína) e FOS (fosfomicina).....	20
Figura V - Percentagem de isolados de <i>Escherichia coli</i> , provenientes de cistites em meio hospitalar, contendo os genes de virulência estudados <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> , e as ilhas de patogenicidade PAI I _{CTF073} e PAI II _{CTF073}	25
Figura VI - Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> , provenientes de em meio hospitalar pelos grupos filogenéticos comensais (A e B1) e patogénicos (B2 e D).	25
Figura VII - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), FOX (cefoxitina), CTX (cefotaxima), CAZ (ceftazidima), GMN (gentamicina), IPM (imipenem) e CIP (ciprofloxacina).	27
Figura VIII - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos FOS (fosfomicina), NT (nitrofurantoína) e SXT (trimetoprim-sulfametoxazol).	28
Figura IX - Perfis de M13-PCR <i>fingerprinting</i> . As amostras representadas a verde são de origem hospitalar, as amarelas são de origem comunitária. M é o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (Nzytech). O perfil M1 foi o predominante.	30

Índice de tabelas

Tabela I - <i>Primers</i> utilizados na pesquisa dos genes de virulência, respectivo tamanho (em pares de bases) e referência.	10
Tabela II - <i>Primers</i> utilizados para a detecção de ESBLs do tipo CTX-M, respectivo tamanho (em pares de bases) e referência.	12
Tabela III - <i>Primers</i> utilizados na pesquisa dos genes de virulência, respectivo tamanho (em pares de bases) e referência bibliográfica.....	13
Tabela IV - Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> pelos grupos filogenéticos patogênicos (B2, D) e comensais (A, B1), de acordo com os genes de virulência <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> e as ilhas de patogenicidade PAI I _{CFT073} e PAI II _{CFT073}	18
Tabela V - Distribuição de genes de virulência <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> , e PAI I _{CFT073} e PAI II _{CFT073} nos grupos filogenéticos B2, D, A e B1.....	19
Tabela VI - Antibiótipo.....	21
Tabela VII - Distribuição dos genes de virulência <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> , PAI I _{CFT073} e PAI II _{CFT073} segundo a suscetibilidade dos isolados.	22
Tabela VIII - Quadro resumo das características dos isolados em que se realizou MLST.	22
Tabela IX – Determinação do <i>Sequence Type</i> (ST).	23
Tabela X - Distribuição dos isolados hospitalares de <i>Escherichia coli</i> pelos grupos filogenéticos patogênicos (B2, D) e comensais (A, B1), de acordo com os genes de virulência <i>fimH</i> , <i>papC</i> , <i>espA</i> , <i>usp</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf1</i> e as ilhas de patogenicidade PAI I _{CFT073} e PAI II _{CFT073}	26

1. Introdução

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais prevalentes com um impacto financeiro substancial para a sociedade^[1].

A *Escherichia coli* uropatogénica é o agente etiológico mais frequentemente isolado nas ITU ^[2], responsável por 70-95% das ITUs da comunidade e aproximadamente 50% das ITUs associadas a cuidados de saúde, estando relacionada com elevada morbidade e mortalidade^[3]. Bactéria Gram-negativa da família das *Enterobacteriaceae*, é predominante na flora intestinal humana como comensal não patogénica^[2, 4]. Contudo algumas das suas variantes são causadoras de infeção tanto no aparelho gastrointestinal, denominando-se de intestinais patogénicas, como fora do aparelho gastrointestinal - extraintestinais patogénicas, das quais a *E. coli* uropatogénica faz parte^[4].

Acredita-se que o reservatório primário seja o trato gastrointestinal humano. A utilização de diversos fatores de virulência específicos por parte da bactéria torna-a capaz de colonizar o trato gastrointestinal e causar infeção e até colonização do trato urinário através de contaminação por via ascendente^[3].

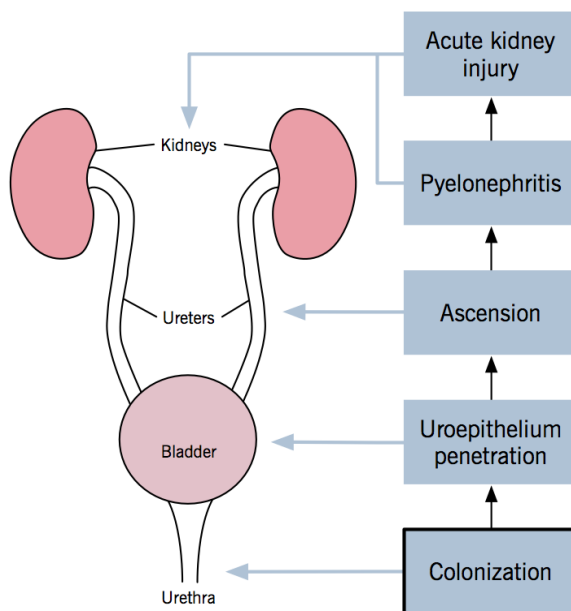


Figura I – Patogénese da infeção do trato urinário^[5].

Os fatores que predis põem à infeção urinária podem ser inerentes ao hospedeiro ou específicos do microrganismo. A cistite ou infeção urinária baixa pode caracterizar-se

como complicada ou não complicada, consoante o hospedeiro esteja ou não associado a determinados fatores de risco, tais como: ser do sexo masculino, a gravidez, a diabetes mellitus não controlada, internamento recente em hospital, uso de catéter urinário e patologias obstrutivas^[1, 6-9]. Estima-se que 20% das mulheres com idade acima dos 18 anos sofrerá de pelo menos uma ITU durante a sua vida^[3], sendo que a taxa de recorrência é elevada.

É aceite pela comunidade científica que a capacidade das estirpes de *E. coli* em causar doença varia de acordo com a presença e o tipo de fatores de virulência que apresentam. Estirpes que possuem mecanismos que promovem a aderência ao epitélio têm maior probabilidade de originar uma ITU do que as estirpes que não os expressam.

1.1. Fatores de virulência e filogenia

A *E. coli* uropatogénica (UPEC) expressa fatores de virulência tais como adesinas, toxinas, sideróforos, proteínas de superfície que contribuem para a colonização, invasão e persistência no trato urinário^[2]. Entre as adesinas mais frequentemente associadas à UPEC estão as fímbrias do tipo 1 (fimH) e as fímbrias do tipo P ou *Pyelonephritis associated pili* (PAP)^[2, 10-11]. As fímbrias tipo 1 são altamente conservadas e extremamente comuns tanto em isolados de UPEC como em comensais e têm sido consideradas dos mais importantes fatores de virulência envolvidos no estabelecimento de uma UTI^[10]. A fimH, a mais representativa destas fímbrias, codificada pelo gene *fimH*, liga-se especificamente à uroplaquina Ia, uma glicoproteína, que é expressa abundantemente na superfície epitelial das células vesicais^[12-13]. Esta ligação estimula a imunidade inata do hospedeiro induzindo a produção de citocinas e quimiotaxia dos neutrófilos ao local. As UPEC conseguem escapar aos mecanismos imunitários invadindo as células epiteliais através de mecanismos fímbriais tipo I dependentes, resistindo à descamação destas mesmas células e arrastamento pela urina. A fimH é ainda tida como importante na formação de biofilme^[14] permitindo à UPEC replicar-se e maturar de modo a resistir à fagocitose.

As fímbrias do tipo P, codificadas pelo operão *pap*, estão associadas a pielonefrite aguda não complicada^[15], encontrando-se o recetor específico disseminado nas membranas celulares das células renais^[8]. Essenciais para a colonização do trato

urinário alto^[16], está descrito que mais de 80% de estirpes de *E. coli* causadoras de pielonefrite expressam fímbrias do tipo P, reconhecidas como determinantes na sua virulência. PapC é a proteína de montagem da membrana externa, necessária à biogénese do *pilus* P^[17]. Outra adesina, a *E. coli* *common pilus* (ECP), codificada pelo gene *ecpA*, tem sido descrita em mais de 75% das estirpes de *E. coli* patogénicas (enterohemorrágica (EHEC) O157:H7^[18] e enterotoxigénica (ETEC)^[19]), assim como em comensais e atribui-se a responsabilidade pela colonização, disseminação e infeção no trato gastrointestinal^[18]. Este *pilus* tipo IV, com capacidades adesivas, é produzido à temperatura de 37°C sem que para tal seja necessária a presença de células alvo^[19].

Relativamente às proteínas excretadas pelas estirpes UPEC, a proteína *uropathogenic-specific protein* (USP), codificada pelo gene *usp*, foi descrita como prevalente nas estirpes urinárias relativamente às estirpes fecais^[20-21], associada a estirpes causadoras de pielonefrite, prostatite e bacteremia^[22].

Entre as citotoxinas destacam-se a α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, que promove a formação de poros com a consequente lise eritrocitária, facilitando a obtenção de nutrientes e a captação de ferro, necessários ao metabolismo bacteriano. Esta toxina é codificada por cerca de 50% dos isolados de UPEC e a sua expressão está associada ao aumento da severidade clínica em doentes com UTI^[10]. Outra proteína, a *cytotoxic necrotizing factor 1* (CNF1), é uma citotoxina com capacidade de induzir apoptose nas células epiteliais da bexiga, estimulando a sua exfoliação e consequente invasão do epitélio. Esta intervém também na inibição da atividade fagocítica e quimiotática dos neutrófilos^[10].

Os genes que codificam estes fatores de virulência podem estar localizados no cromossoma ou em elementos genéticos móveis tais como plasmídeos ou ilhas de patogenicidade (PAIs). As PAI têm a capacidade de associação e transporte de genes codificadores de adesinas, toxinas, sideróforos, cápsulas, de forma horizontal entre espécies bactérias, e caracterizam-se geneticamente por terem tamanho superior a 10 kilobases, conteúdo G+C diferente do cromossoma bacteriano e inserirem-se na vizinhança ou mesmo no terminal 3' do RNA de transferência^[23-25]. Entre as oito ilhas de patogenicidade conhecidas em *E. coli* destacam-se as PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} em que a primeira possui o operão onde estão os genes que codificam para a α -hemolisina, assim como o operão Pap (fímbria do tipo P), e a segunda apenas o operão Pap^[23].

A fronteira entre comensalismo e patogenicidade tem suscitado aos investigadores o desenvolvimento de metodologias que permitam esclarecer se uma estirpe de *E. coli* pode ser considerada comensal ou patogénica e vice-versa, e quais as características que as diferenciam. Clermont *et al*^[26] desenvolveram um algoritmo baseado na deteção de três genes conservados, o que permite agrupar as estirpes de *E. coli* em quatro grupos filogenéticos – A, B1, B2, D – sendo que as estirpes extraintestinais patogénicas pertencem maioritariamente ao grupo B2 e em menor número ao grupo D, enquanto as comensais pertencem aos grupos A e B1^[26-27]. A técnica consiste na pesquisa de dois genes e um fragmento de DNA, através de PCR, que constituem marcadores específicos dos grupos filogenéticos. O gene *chuA* é requerido para o transporte de heme na *E. coli* enterohemorrágica O157:H7; o gene *yjaA*, inicialmente identificado na *E. coli* K-12 e cuja função é desconhecida, e um fragmento de DNA designado de TSPE4.C2^[26].

1.2. Resistência aos antibióticos e terapêutica das ITU

As ITUs, e particularmente a cistite aguda não complicada, continuam a ser uma das mais comuns indicações para a prescrição de antibióticos em mulheres saudáveis na comunidade. Aproximadamente 15% de todos os antibióticos prescritos nos EUA na comunidade são dispensados para a ITUs, e dados de alguns países europeus sugerem uma taxa semelhante^[1].

O tratamento da cistite não complicada é normalmente iniciado empiricamente, antes da identificação do agente etiológico. Sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico predominantemente isolado, torna-se fundamental o conhecimento atualizado do seu perfil de suscetibilidade aos antibióticos vulgarmente utilizados na terapêutica^[28].

Nas últimas décadas, o tratamento das ITUs provocadas por *E. coli* tem-se tornado um desafio devido ao aumento de resistências aos antibióticos também na comunidade. Inicialmente as resistências eram limitadas à terapêutica específica tal como ampicilina e trimetoprim^[29], tendo o universo das resistências expandido, abrangendo os beta-lactâmicos, quinolonas e fosfomicina^[30].

Segundo as *Guidelines on Urological Infections* da *European Association of Urology*^[1], a terapêutica empírica recomendada em cistites não complicadas consiste em fosfomicina/ trometamol ou nitrofurantoína. Como alternativa as fluoroquinolonas

ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina ou ofloxacina. Em último caso, e para países cuja taxa de resistências seja <20% em *Escherichia coli*, o trimetoprim/sulfametoxazol ou trimetoprim.

A duração da terapêutica consiste em toma única para a fosfomicina/ trometamol, três dias para as fluoroquinolonas e trimetoprim/sulfametoxazol, cinco dias para trimetoprim e cinco a sete dias para a nitrofurantoína.

Em presença de recorrência, uma abordagem efetiva consiste na profilaxia com cefalosporinas, fosfomicina, ou uma fluoroquinolona, trimetoprim/sulfametoxazol, trimetoprim, ou nitrofurantoína. São ainda considerados os probióticos intravaginais ou orais e o arando, rico em proantocianidina A.

Nas grávidas, o trimetoprim e as fluoroquinolonas são contra indicados, recaindo a escolha para a nitrofurantoína, amoxicilina/ ác. clavulânico ou fosfomicina. A amoxicilina e a cefalexima (cefalosporina de 1ª geração) apresentam um aumento de resistências^[1].

A fosfomicina é um dos fármacos mais eficazes na terapêutica da ITU. Atua na síntese do peptidoglicano, componente essencial da parede bacteriana, e quando utilizada na forma de sal de trometamol não é inativada pela acidez estomacal. Possui assim uma elevada biodisponibilidade, tanto que após quatro horas da toma única de 3g, a concentração é 350 vezes maior que a concentração mínima necessária para a inibição de *E. coli*, permanecendo elevada até 48 a 74 horas. Tal eficácia facilita a eliminação do agente etiológico, impedindo a seleção de estirpes multirresistentes^[31]. A resistência à fosfomicina existe e está descrita, sendo vários os mecanismos de resistência conhecidos. O mais frequente está associado a mutações cromossômicas que podem afetar o funcionamento dos sistemas de transporte da glucose-6-fosfato ou do glicerol-3-fosfato, causando impermeabilidade da célula ao fármaco^[32].

A nitrofurantoína é um antibiótico eficaz na infeção do trato urinário para o qual não há desenvolvimento significativo de resistência. A suscetibilidade das bactérias encontra-se relacionada com a presença de nitrorredutases que a convertem em compostos altamente reativos. Estes compostos atacam as proteínas ribossomais bacterianas não especificamente, provocando a inibição completa da síntese proteica^[33].

A produção de beta-lactamases é o mecanismo mais importante de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas^[34]. As beta-lactamases de

espectro alargado (ESBL) têm sido amplamente descritas desde a sua primeira identificação em 1983, um pouco por todo o mundo^[34]. Em *E. coli*, a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos até à década de 90 era conferida essencialmente por beta-lactamases de espectro alargado do tipo TEM ou SHV, codificadas por plasmídeos^[35-36]. Em Portugal, a primeira ESBL identificada foi a TEM-10 em 1999, num isolado de *Morganella morganii* da urina de um homem internado no Hospital de Santa Maria^[37]. Em 2000 tornava-se evidente a disseminação das ESBLs em outras espécies bacterianas, nomeadamente em *Klebsiella pneumoniae* no mesmo hospital^[38], em associação com os determinantes de resistência aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas^[30].

As enzimas CTX-M-*type*, também consideradas ESBL, vieram gradualmente substituir as clássicas TEM e SHV-*type*^[39-40]. Estas enzimas surgiram no início dos anos 90, na África do Sul^[35], tendo a CTX-M-15 sido pela primeira vez descrita em 1999 em isolados de *Enterobacteriaceae* na Índia^[41]. Em Portugal, as primeiras estirpes documentadas com o gene *bla*_{CTX-M} datam de 2001^[36], tendo-se verificado desde então uma prevalência de *E. coli* produtora de beta-lactamases, com especial relevância para as enzimas CTX-M-*type*^[35]. Em 2008, dois grupos de investigadores verificaram que populações de *E. coli* produtoras de CTX-M-15 provenientes de doentes do meio hospitalar e da comunidade estavam relacionadas entre si e inseriam-se num grupo clonal, distribuído por todo o mundo^[30, 39, 42]. A sua disseminação a nível global é das mais conhecidas e bem documentadas^[43], representando um enorme problema de saúde pública^[30].

Relativamente às fluoroquinolonas e segundo o relatório da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), Portugal tinha em 2014, para a *E. coli*, uma das taxas de resistência mais elevada da Europa (32,4%), em que a sua progressão tem sido crescente no nosso país^[44]. A resistência às quinolonas é um problema desde que o ácido nalidíxico foi introduzido na terapêutica. O surgimento das fluoroquinolonas e as mais-valias associadas, comparativamente às quinolonas, permitiram resultados terapêuticos excelentes, o que levou ao aumento da sua utilização conduzindo a uma taxa crescente de resistências.

Durante anos admitiu-se que a aquisição de resistência às quinolonas se encontrava apenas associada a mutações. Estas consistiam de mutações cromossómicas dos genes

que codificam as subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) e mutações que diminuíam a concentração do fármaco dentro da célula bacteriana, quer por diminuição da permeabilidade da membrana ao fármaco, quer por aumento de expressão de bombas de efluxo^[45-47]. Em 1998 o primeiro mecanismo de resistência às quinolonas mediado por plasmídeo é reportado^[48]. O gene *qnr* (atualmente *qnrAI*) codifica uma proteína que protege a DNA-girase e a topoisomerase IV da sua inativação pelas fluoroquinolonas. Mais recentemente, o gene *aac(6')-Ib-cr* que codifica para uma aminoglicosídeo acetiltransferase, mostrou que confere reduzida suscetibilidade à ciprofloxacina por acetilação do seu anel^[45-47].

Os mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos têm sido frequentemente associados à disseminação das ESBL em todo o mundo, principalmente nos plasmídeos tipo IncF em Enterobacteriaceae, ambos geralmente localizados no mesmo plasmídeo^[46].

1.3. Caracterização genotípica

A caracterização genotípica tornou-se um objetivo importante nas investigações epidemiológicas de agentes patogénicos, sendo as ferramentas de genotipagem indispensáveis à confirmação e estudo de surtos, assim como mais-valias na caracterização dos organismos.

Os métodos baseados em PCR e PFGE dependem da comparação de padrões electroforéticos, podendo estar sujeitos a variabilidade interlaboratorial^[49]. O *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) baseia-se em estabelecer um perfil alélico ST (*Sequence Type*) por análise da sequência de fragmentos internos de sete genes *housekeeping*, apresentando vantagem relativamente aos métodos de *fingerprinting* que dependem da análise subjetiva de um perfil de bandas de eletroforese em gel de agarose. A proximidade genética entre isolados pode ser comparada, podendo organismos relacionados ser agrupados como complexos clonais^[50]. A portabilidade e a reprodutibilidade do MLST entre laboratórios traz vantagens significativas para o estudo da epidemiologia de agentes patogénicos emergentes, assim como a construção da base de dados de MLST (para uma variedade de outros organismos que não só *E. coli*) e contribui para a compreensão da distribuição clonal global dos agentes patogénicos^[51].

A existência de um ST predominante, o ST-131, uma linhagem de *E. coli* extraintestinal patogénica, comumente identificada em estirpes produtoras de CTX-M-15^[52-54], sugere que esta poderá ter adquirido determinantes de virulência que lhe permitam superar os mecanismos de defesa do hospedeiro, disseminando-se tanto no meio hospitalar como na comunidade^[51, 55]. As características clínicas da doença induzida pelo ST131 são semelhantes aos das outras *E. coli*, vão desde um quadro típico de cistite não complicada a sépsis^[30, 54]. Em 2008, num estudo em populações de *E. coli* produtoras de CTX-M-15, incluídas no grupo clonal ST131 apresentavam o mesmo serogrupo O25b e um extenso leque de genes de virulência presente^[39, 42]. Trata-se de um clone emergente, relacionado com a disseminação global de CTX-M-15, com elevada patogenicidade e capacidade invasiva, a julgar pela sua elevada prevalência em isolados sanguíneos^[51, 53-55]. Desde a sua descoberta, investigadores têm-no documentado retrospectivamente como emergência pandémica entre isolados produtores de ESBL e outros isolados clínicos resistentes a antimicrobianos até meados de 2005, apenas se encontrando identificados casos esporádicos anteriormente a esta data^[54].

1.4. Objetivo

Este estudo teve como objetivo verificar a existência ou não de uma correlação entre a resistência aos antibióticos e a virulência apresentada pelos isolados bacterianos da comunidade e do meio hospitalar.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estirpes bacterianas

Numa primeira fase foram estudadas 250 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de urinas de mulheres com idade inferior ou igual a 59 anos. Dos 250 isolados de *E. coli*, 183 eram oriundos de cistites consideradas não complicadas (ncITU) e os restantes 67 de cistites consideradas complicadas (cITU), dos quais 46 pertenciam a grávidas, 28 apresentavam recorrência da infeção e 8 eram diabéticas. As bactérias provinham de vários laboratórios portugueses de prestação de serviços à comunidade, tendo sido identificadas nos laboratórios de origem e posteriormente enviadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Numa segunda fase foram estudadas 50 estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de urinas de doentes, todos relacionados com internamento hospitalar da área metropolitana de Lisboa e Algarve, em que as variáveis idade, sexo e fatores de risco dos doentes não foram possíveis de averiguar.

2.2. Determinação da suscetibilidade aos antibióticos

A suscetibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos foi efetuada pelo método de difusão em disco, em meio de Mueller-Hinton, de acordo com as normas EUCAST e CLSI (no caso da fosfomicina). Os antibióticos estudados foram: amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), fosfomicina (50µg), nitrofurantoína (300µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75µg), amoxicilina (25µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg) e gentamicina (10µg). Estes antibióticos foram selecionados tendo em conta a prescrição habitual no tratamento de infeções urinárias e a deteção de determinados mecanismos de resistência aos vários grupos de antibióticos: beta-lactâmicos (produção de ESBLs, cefalosporinases e carbapenemases), aminoglicosídeos e quinolonas.

2.3. Métodos Moleculares

2.3.1. Pesquisa de genes de virulência e identificação dos grupos filogenéticos

A pesquisa dos genes de virulência (*fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* e *cnf1*), das ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} e do grupo filogenético (*chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2) foi efetuada no DNA genômico extraído pela técnica de *boiled*^[36], em anexo. Os produtos foram obtidos após amplificação pela técnica de PCR com *primers* específicos para os genes em estudo^[19, 26, 56-59] (tabela I).

Tabela I - Primers utilizados na pesquisa dos genes de virulência, respectivo tamanho (em pares de bases) e referência.

Gene	Sequência (5'-3')	pb	Referência
<i>ecpA</i>	F - AAG CTG GTT GTG ACG CCA C	336	[19]
	R - GAA ACC ATC CTG TGC GGT G		
<i>fimH</i>	F - AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	465	[57]
	R - ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC		
<i>papC</i>	F - GAGTTATACGGGAGCCAGCCT	1174	[60]
	R - GGAAGCACTGACGCCGAAAGA		
<i>usp</i>	F - CCG AGT AGT GTG TTG GCG AC	1000	[59]
	R - GTC GGG GCG TAA CAA TCC T		
<i>hlyA</i>	F - AGATTCTTGGGCATGTATCCT	571	[57]
	R - TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT		
<i>cnf1</i>	F - TTATATAGTCGTCAAGATGGA	634	[57]
	R - CACTAAGCTTTACAATATTGA		
Filogenia	<i>chuA</i> F - GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	[26]
	R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	<i>YjaA</i> F - TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211	[26]
	R - ATGGAGAATGCGTTTCCTCAAC		
	TspE4C2 F - GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	[26]
	R - CGCGCCAACAAAGTATTACG		
PAI I _{CFT073}	F - GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	920	[58]
	R - TCGCCACCAATCACAGCGAAC		
PAI II _{CFT073}	F - ATGGATGTTGTATCGCGC	425	[56]
	R - ACGAGCATGTGGATCTGC		

As condições de PCR (ver Anexo I) foram adaptadas tendo em conta a enzima Taq polimerase utilizada e as temperaturas de *melting* dos primers em estudo. A mistura de reação foi também adaptada às características da Taq sendo que para um volume final de 25µl esta compôs-se de 12,5µl de Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) da Thermo Fisher Scientific, 8,5 µl de água livre de nucleases (ou ABE), 2µl de amostra, 1µl de *primer forward*, 1µl de *primer reverse*. No caso particular da determinação do grupo filogenético foi realizada uma amplificação conjunta, isto é, um multiplex para a pesquisa de três genes, consistindo a mistura de 12,5µl de Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 4,5 µl de água livre de nucleases, 2µl de amostra, 1µl de cada *primer forward* (total de 3µl), 1µl de *primer reverse* (total de 3µl).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE 1%. As condições de corrida para um gel grande foram de 150 Vots, 400 mA, por 1h. Em cada poço aplicaram-se 5 µl de reação e em alguns casos adicionou-se 2 µl de azul de bromofenol para melhor visualização da progressão da corrida. De seguida, a coloração do gel foi realizada em brometo de etídio, com tempos variáveis e posteriormente observados e fotografados em transiluminador de UV. Após amplificação dos produtos, estes foram confirmados por sequenciação e as sequências nucleotídicas e aminoacídicas foram analisadas por *software* disponível no *National Centre for Biotechnology Information*^[61].

2.3.2. Pesquisa de Beta-lactamases de espectro alargado

A pesquisa de beta-lactamases do tipo CTX-M foi efetuada pela técnica de PCR (condições em Anexo I) recorrendo a *primers consensus* (tabela II), escolhidos de regiões com elevado nível de homologia com os genes *bla*_{CTX-M}, tendo sido identificada o tipo de CTX-M após sequenciação do produto de amplificação^[43]. Este estudo foi realizado nos isolados hospitalares (n=42) e numa pequena amostra de isolados comunitários multirresistentes (n=5) que apresentavam um perfil de suscetibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos suspeito de produção de beta-lactamases do tipo CTX-M (resistência à cefotaxima, à ceftazidima, suscetibilidade à cefoxitina).

A mistura de reação foi realizada com as mesmas quantidades e componentes utilizados para a pesquisa dos genes de virulência. A separação por eletroforese em gel de agarose a 1% também teve as características anteriormente referidas.

Tabela II - Primers utilizados para a detecção de ESBLs do tipo CTX-M, respetivo tamanho (em pares de bases) e referência.

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>pb</i>	<i>Referência</i>
CTX-1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	544	[43]
CTX-2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG		

2.3.3. Tipificação dos isolados bacterianos

2.3.3.1. M13-PCR *fingerprinting*

A técnica M13-PCR *fingerprinting*, como método de tipificação simples, foi utilizada para o *screening* de isolados relacionados entre si, de acordo com o procedimento descrito por Grundmann *et al*^[62] (e Anexo I). Este método baseia-se na amplificação de regiões do cromossoma, de modo aleatório, com o *primer* M13, desenhado a partir da região core do bacteriófago M13. A mistura de reação foi realizada com as mesmas quantidades e componentes anteriormente referidos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em meio TAE a 1%, com condições de corrida para um gel grande de 150 Vots, 400 mA, até os fragmentos migrarem 10 cm do poço de aplicação. Os resultados foram visualizados após coloração com brometo de etídio. O perfil de bandas obtido foi avaliado visualmente^[36]. Esta técnica permite visualizar diferentes perfis electroforéticos e foi utilizada nos isolados hospitalares e comunitários multirresistentes, produtores de CTX-M-15.

2.3.4. MLST

A determinação do *Sequence Type* (ST) foi realizada através de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para isolados tanto da comunidade como hospitalares. A indicação dos *primers* (tabela III) assim como as condições de amplificação (Anexo I) e análise da

sequência dos alelos está disponível no *site MLST Databases at University of Warwick* [63]. A mistura de reação foi realizada com as mesmas quantidades e componentes já citados, tendo as condições de corrida sido iguais às já referidas.

Tabela III - Primers utilizados na pesquisa dos genes de virulência, respetivo tamanho (em pares de bases) e referência bibliográfica.

Primers	Sequência (5'-3')	pb	Referência
<i>adkF</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	[63]
<i>adkR</i>	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumCF</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	[63]
<i>fumCR</i>	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrBF</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	[63]
<i>gyrBR</i>	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icdF</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	[63]
<i>icdR</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdhF</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTG CTGGCGG	932	[63]
<i>mdhR</i>	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGA TATCTTTCTT		
<i>purAF</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	[63]
<i>purAR</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recAF</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	[63]
<i>recAR</i>	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

Após purificação dos produtos de PCR, realizada recorrendo ao kit *JETquick Spin Column*, (Genomed), segundo as instruções do fabricante, os produtos de PCR foram enviados para a Stab Vida para sequenciação.

2.3.5. Determinação do clone O25b-ST131

Para este estudo foram considerados dois grupos de 40 isolados, o primeiro grupo consistindo de isolados da comunidade, negativos para o gene *bla_{CTX-M}* e pertencentes ao grupo filogenético B2. O segundo grupo abrangeu isolados multirresistentes

hospitalares assim como comunitários, tendo como características comuns serem todos positivos para o gene *bla_{CTX-M}* e produtores de ESBL CTX-M-15, pertencentes a diferentes grupos filogenéticos.

Este ensaio teve como base a pesquisa por PCR de um fragmento com cerca de 347 pb do gene *pabB*, específico dos isolados pertencentes ao clone O25b-ST131, segundo Clermont *et al*^[55] (condições de PCR em Anexo I). Este gene foi pesquisado com a ajuda dos *primers* O25pabBspe.F (5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3') e O25pabBspe.R (5'-GCGAAATTTTTCGCCG TACTGT-3'), tendo sido desenhados de modo a incluir regiões conservadas do gene *pabB*, sendo contudo os nucleótidos 3' de ambos os primers específicos de isolados do grupo B2 subgrupo I do tipo O25b. Como controlo positivo utilizou-se o gene *trpA* de 785 pb. Tanto *pabB* como *trpA* pertencem ao conjunto de genes estudados na determinação do ST desenvolvido pelo Instituto Pasteur^[64].

2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS utilizando o teste exato de Fisher e qui-quadrado. O limite de significância estatística foi um valor de $P \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Amostras da comunidade

3.1.1. Caracterização da amostra clínica

O diagnóstico de cistite foi baseado nos sintomas clínicos como ardor à micção, poliquiúria e urgência urinária; e na análise cito-bacteriológica da urina, a identificação de uma espécie bacteriana, em número de colônias superior a 10^5 UFC/ml, associada à presença de leucocitúria. Dos 250 isolados de *E. coli*, 183, correspondendo a 73,2%, foram identificados de urinas de mulheres sem fatores de risco, consideradas cistites não complicadas (ncITU). Os restantes 67 isolados, equivalendo a 26,8%, eram provenientes de urinas de mulheres, que se diferenciaram dos critérios de inclusão das ncITU porque apresentavam um ou mais fatores como recorrência da infecção (n=28), gravidez (n=46) e diabetes (n=8), ao que se englobaram nas cistites complicadas (cITU)^[1].

3.1.2. Genes de virulência

Na pesquisa dos genes de virulência observou-se um padrão de prevalência idêntico entre isolados de cistite não complicada e complicada, sendo que o gene mais frequente foi *ecpA*, seguido de *fimH*, tal como é observado na figura I. Nos 67 isolados de cITU os genes *ecpA* e *fimH* foram identificados em 94,0% (n=63) e 79,1% (n=53), respetivamente. Da mesma forma, nos 183 isolados de ncITU os genes *ecpA* e *fimH* foram encontrados em 84,2% (n=154) e 82,0% (n=150). Para os restantes genes de virulência estudados (*papC*, *usp*, *hlyA* e *cnfI*) foram encontrados valores dentro da mesma ordem, ou seja entre 20,2% e 32,8%.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de genes em ncITU e cITU.

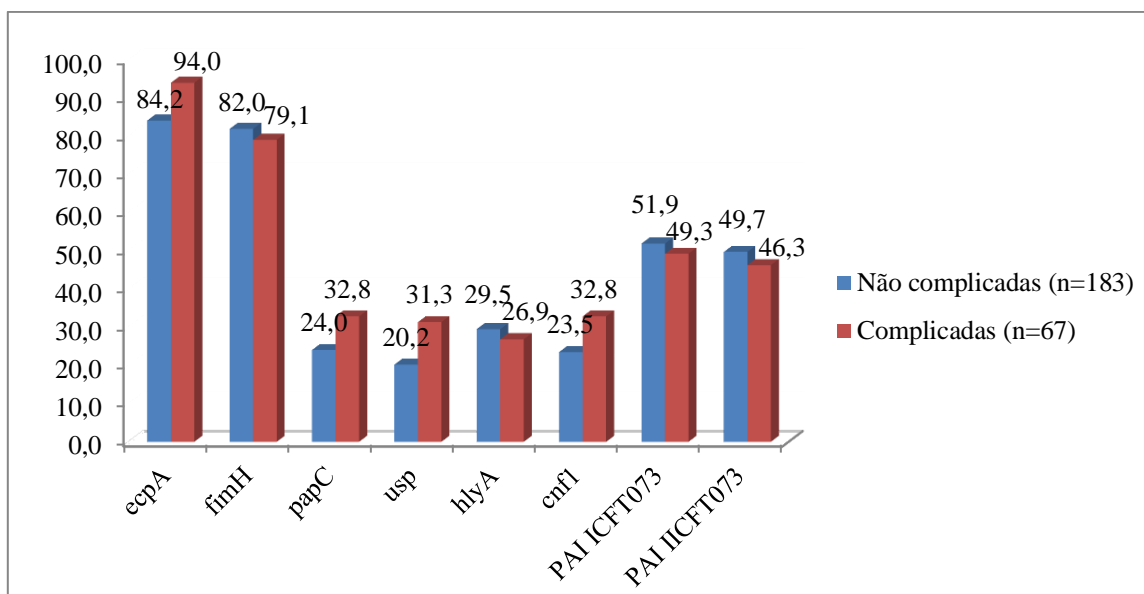


Figura II - Percentagem de isolados de *Escherichia coli*, provenientes de cistites não complicadas e cistites complicadas, contendo os genes de virulência estudados *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}.

3.1.3. Relação dos fatores de virulência e os grupos filogenéticos

Os 250 isolados de *E. coli* distribuíram-se entre os grupos filogenéticos B2, D, A e B1, de acordo com a figura II. Nos dois grupos A e B1, onde se classificam as bactérias consideradas comensais, encontram-se 46 dos 183 isolados associados às ncITU e que se distribuíram pelo grupo A (19,7%; n=36) e pelo grupo B1 (5,5%; n=10), enquanto a maioria dos isolados de ncITU (n=137) pertenceram aos grupos patogénicos B2 e D em percentagem semelhante, de 39,3% (n=72) e 35,5% (n=65), respetivamente (figura IIA). Dos 67 isolados representados na figura IIB, provenientes de cITU, verificou-se que na sua maioria (n=55) pertenciam aos grupos patogénicos B2 (58,2%; n=39) e D (23,9%; n=16), correspondendo 10,4% (n=7) ao grupo A e 8,5% (n=5) ao grupo B1.

Ao analisar os resultados expressos na tabela IV, relativamente aos isolados provenientes de cITU e ncITU, verificou-se que tanto os isolados comensais (A e B1) como os patogénicos (B2 e D) apresentaram todos os genes (*fimH*, *papC*, *ecpA*) que estão implicados na expressão de proteínas de aderência celular e colonização do hospedeiro.

Inclusivamente no grupo de isolados comensais provenientes de cITU só foram detetados genes de colonização.

Relativamente a cada grupo filogenético, não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genéticas entre isolados de ncITU e cITU, a não ser no caso do gene *usp* que no grupo B2 foi mais frequente em isolados de cITU (48,7%) que em ncITU (22,2%) com *P* value de 0,006.

Verificou-se estatisticamente que os genes que codificam para as proteínas responsáveis por processos invasivos (*usp*, *hlyA* e *cnfI*), encontraram-se em valores significativamente mais elevados nos isolados do grupo B2 comparativamente aos grupos D, A e B1 (tabela V).

Quando se relacionou a presença dos genes de virulência entre grupos filogenéticos, verificou-se que os 13 isolados, em que foram identificados todos os genes em estudo, distribuíram-se maioritariamente pelos grupos filogenéticos patogénicos B2 (n=7) e D (n=5).

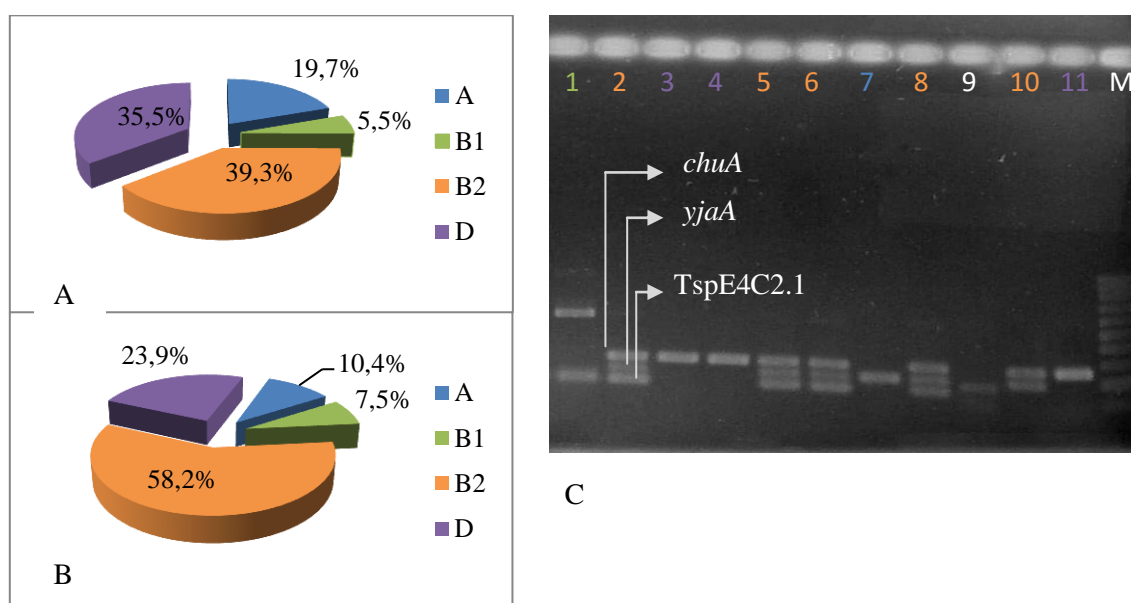


Figura III - Distribuição dos isolados de *Escherichia coli*, provenientes de cistites não complicadas (A) e cistites complicadas (B), pelos grupos filogenéticos comensais (A e B1) e patogénicos (B2 e D). (C) Determinação do grupo filogenético através das combinações dos genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) e do fragmento de DNA TspE4C2.1 (152 pb). Poços 2, 5, 6, 8 e 10 – grupo B2; poços 3, 4 e 11 – grupo D; poço 7 – grupo A; poço 1 – grupo B1; poço 9 – indeterminado; M – marcador de peso molecular NZDNA Ladder V (Nzytech).

Tabela IV - Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* pelos grupos filogenéticos patogênicos (B2, D) e comensais (A, B1), de acordo com os genes de virulência *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnfI* e as ilhas de patogenidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}.

	B2				D				A				B1			
	ncITU (n=72)		cITU (n=39)		ncITU (n=65)		cITU (n=16)		ncITU (n=36)		cITU (n=7)		ncITU (n=10)		cITU (n=5)	
<i>fimH</i>	64	88,9%	31	79,5%	51	78,5%	13	81,3%	27	75,0%	6	85,7%	8	80,0%	3	60,0%
<i>papC</i>	19	26,4%	14	35,9%	15	23,1%	5	31,3%	8	22,2%	2	28,6%	2	20,0%	1	20,0%
<i>ecpA</i>	62	86,1%	38	97,4%	52	80,0%	16	100,0%	30	83,3%	4	57,1%	10	100,0%	5	100,0%
<i>usp</i>	16	22,2%	19	48,7%	12	18,5%	2	12,5%	6	16,7%	-	-	3	30,0%	-	-
<i>hlyA</i>	38	52,8%	15	38,5%	9	13,8%	3	18,8%	7	19,4%	-	-	-	-	-	-
<i>cnfI</i>	25	34,7%	20	51,3%	10	15,4%	2	12,5%	7	19,4%	-	-	1	10,0%	-	-
PAI I _{CFT073}	60	83,3%	27	69,2%	26	40,0%	6	37,5%	8	22,2%	-	-	1	10,0%	-	-
PAI II _{CFT073}	56	77,8%	26	66,7%	21	32,3%	5	31,3%	12	33,3%	-	-	2	20,0%	-	-

Legenda: ncITU – infecção do trato urinário não complicada; cITU - infecção do trato urinário complicada.

Tabela V - Distribuição de genes de virulência *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnfI*, e PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} nos grupos filogenéticos B2, D, A e B1.

Genes	Nº e (%) de isolados de <i>E. coli</i>								P value				
	B2 n=111		D n=81		A n=43		B1 n=15		B2 vs D	B2 vs A	B2 vs B1	D vs A	D vs B1
<i>ecpA</i> (n=217)	100	90,1	68	84,0	34	79,1	15	100,0					
<i>fimH</i> (n=203)	95	85,6	64	79,0	33	76,7	11	73,3					
<i>papC</i> (n=66)	33	29,7	20	24,7	10	23,3	3	20,0					
<i>usp</i> (n=58)	35	31,5	14	17,3	6	14,0	3	20,0	0,03	0,027			
<i>hlyA</i> (n=72)	53	47,7	12	14,8	7	16,3	-	-	<0,001	<0,001	<0,001		
<i>cnfI</i> (n=65)	45	40,5	12	14,8	7	16,3	1	6,7	<0,001	0,004	0,01		
PAI I _{CFT073} (n=128)	87	78,4	32	39,5	8	18,6	1	6,7	<0,001	<0,001	<0,001	0,026	0,016
PAI II _{CFT073} (n=122)	82	73,9	26	32,1	12	27,9	2	13,3	<0,001	<0,001	<0,001		

3.1.4. Relação das ilhas de patogenicidade com os grupos filogenéticos

Quanto às ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}, estas foram detetadas com valores na ordem dos 51,9% e 49,7% respetivamente (figura I), sendo a sua presença superior nas estirpes do grupo filogenético B2 em ncITU (tabela IV) com valores de 83,3% para a PAI I_{CFT073} e 77,8% para a PAI II_{CFT073} (não havendo diferença estatística entre os grupos ncITU e cITU). Nos grupos A e B1, nomeadamente em cistites complicadas, não foram detetadas ilhas de patogenicidade embora sejam provenientes de dez grávidas, três delas com recorrência, e de duas mulheres diabéticas.

Por outro lado, segundo a tabela V, a PAI I_{CFT073} foi prevalente no grupo B2 (78,4%), seguido de D (39,5%; *P* value <0,001) e dos grupos comensais A (18,6%) e B1 (6,7%), não havendo diferença estatística entre os dois últimos. No caso da PAI II_{CFT073}, verificou-se apenas a sua superioridade nos isolados do grupo B2 face aos restantes, (*P* value <0,001).

3.1.5. Suscetibilidade aos antibióticos, filogenia e virulência

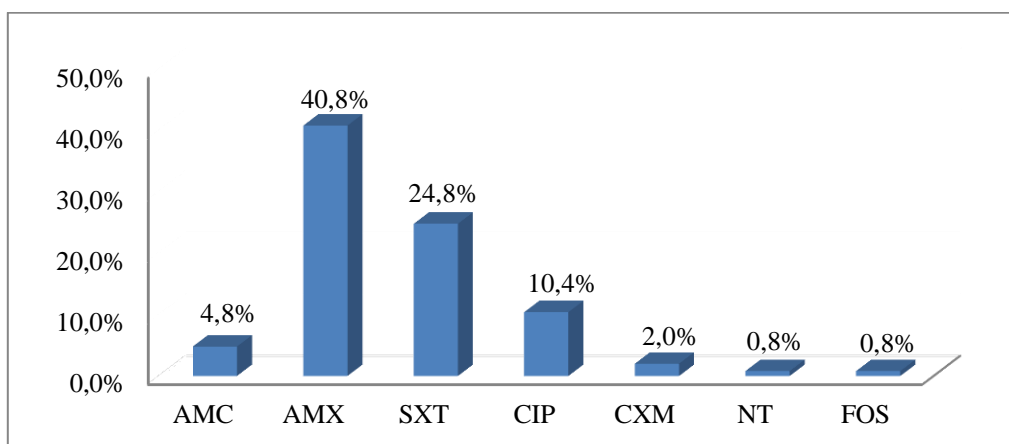


Figura IV - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), AMX (amoxicilina), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol), CIP (ciprofloxacina), CXM (cefuroxima), NT (nitrofurantoína) e FOS (fosfomicina).

O estudo de suscetibilidade aos antibióticos mais utilizados na terapêutica empírica revelou que 52% (n=130) das estirpes eram suscetíveis a todos os antibióticos em estudo enquanto 48% (n=120) eram resistentes a pelo menos um dos antibióticos em teste. De acordo com a figura III, 40,8% (n=102) das estirpes eram resistentes à amoxicilina, 24,8% (n=62) ao trimetoprim-sulfametoxazol e 10,4% (n=26) à ciprofloxacina. A fosfomicina e a nitrofurantoína foram os antibióticos com menos resistências associadas (0,8%; n=2), seguido da cefuroxima (2,0%; n=5) e amoxicilina/ácido clavulânico (4,8%; n=12).

Através da análise da tabela VI onde está representada a distribuição dos isolados de acordo com o antibiótico, filogenia e fatores de virulência em estudo, observou-se que dos isolados suscetíveis (n=130), 102 pertenciam aos grupos filogenéticos patogênicos B2 e D. Tanto nos isolados suscetíveis como nos resistentes aos antibióticos em estudo, os pertencentes aos grupos patogênicos foram na sua maioria predominantes.

Verificou-se que os fatores de colonização EcpA e FimH predominaram em relação a PapC e aos fatores de invasão, tanto nos isolados patogênicos como comensais.

Também foi nos isolados patogênicos que as duas ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} foram encontradas em maior percentagem.

Segundo a tabela VII, onde se encontra esquematizada a diferença de prevalência dos fatores de virulência entre isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e isolados

suscetíveis, verificou-se que as frequências genéticas dos dois grupos se revelaram muito homogêneas, encontrando-se estatisticamente diferente apenas para o gene *cnfI* (P value=0,021), que foi mais prevalente em isolados suscetíveis aos antibióticos ($cnfI=32,3\%$) do que em isolados resistentes ($cnfI=19,2\%$).

Tabela VI - Antibiótipo

	Antibiótipo	Filogenia	n	Fatores de colonização			Fatores de invasão			Ilhas de Patogenicidade	
				EcpA	FimH	PapC	Usp	HlyA	CNF1	PAI I _{CFT073}	PAI II _{CFT073}
	Suscetíveis n=130	B2	65	58	55	22	22	31	32	48	48
		D	37	31	28	7	5	6	4	16	7
		A	19	15	16	6	5	6	6	6	7
		B1	9	9	6	2	2	0	0	1	1
	Resistentes aos antibióticos n=120	B2	46	42	40	11	13	22	13	39	34
		D	44	37	36	13	9	6	8	16	19
		A	24	19	17	4	1	1	1	2	5
		B1	6	6	5	1	1	0	1	0	1
1	AMX - SXT - CIP n=12	B2	2	2	2	0	0	0	0	2	2
		D	7	4	7	1	0	0	0	1	3
		A	3	3	3	0	0	0	0	0	1
2	AMX - SXT n=34	B2	9	8	8	1	3	4	0	7	7
		D	17	16	14	5	4	1	2	6	6
		A	6	5	2	0	0	0	0	1	2
3	AMX - CIP n=4	B1	2	2	2	0	0	0	0	0	1
		B2	1	1	1	0	0	1	1	1	1
		A	3	2	3	0	0	0	0	0	0
4	SXT - CIP n=8	D	2	2	1	0	0	0	0	0	0
		A	6	4	5	2	1	0	0	0	0
5	AMX n=52	B2	29	27	25	9	8	17	11	26	24
		D	16	13	13	6	5	5	6	9	10
		A	4	3	3	2	0	1	1	1	1
		B1	3	3	2	1	1	0	1	0	0
6	SXT n=8	B2	4	3	3	1	2	0	1	2	0
		D	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		A	2	2	1	0	0	0	0	0	1
7	CIP n=2	B1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		B2	1	1	1	0	0	0	0	1	0
		D	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Legenda - 1) Estirpes resistentes à AMX (amoxicilina), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol) e CIP (ciprofloxacina); 2) Estirpes resistentes à AMX (amoxicilina) e SXT (trimetoprim-sulfametoxazol); 3) Estirpes resistentes à AMX (amoxicilina) e CIP (ciprofloxacina); 4) Estirpes resistentes ao SXT (trimetoprim-sulfametoxazol) e CIP (ciprofloxacina); 5) Estirpes resistentes apenas à AMX (amoxicilina); 6) Estirpes resistentes apenas ao SXT (trimetoprim-sulfametoxazol); 7) Estirpes resistentes apenas à CIP (ciprofloxacina).

Tabela VII - Distribuição dos genes de virulência *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnfI*, PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} segundo a suscetibilidade dos isolados.

	<i>ecpA</i>	%	<i>fimH</i>	%	<i>papC</i>	%	<i>usp</i>	%	<i>hlyA</i>	%	<i>cnfI</i>	%	PAI I _{CFT073}	%	PAI II _{CFT073}	%
Susc																
130	113	86,9	105	80,8	37	28,5	34	26,2	43	33,1	42	32,3	71	54,6	63	48,5
R Ab																
120	104	86,7	98	81,7	29	24,2	24	20,0	29	24,2	23	19,2	57	47,5	59	49,2

Legenda - Susc – suscetibilidade aos antibióticos; R Ab – resistência aos antibióticos

3.1.6. MLST

A determinação do *Sequence Type* (ST) realizou-se selecionando 7 isolados com características distintas entre si das quais o grupo filogenético; a sua origem geográfica; o facto de provirem de cistites complicadas (n=3) e de não complicadas (n=4); a apresentação de perfis distintos de sensibilidade aos antibióticos em que alguns dos isolados mostravam maior resistência aos antibióticos do que outros; os distintos perfis de virulência, em que os isolados diferiam grandemente em relação à quantidade de genes de virulência ilhas de patogenicidade que apresentavam.

Tabela VIII - Quadro resumo das características dos isolados em que se realizou MLST.

Lab	ST	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>ecpA</i>	<i>usp</i>	Filo	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	PAI I _{CFT073}	PAI II _{CFT073}	Resistência
Lamego	58	+	-	+	-	A	-	-	-	-	AMX, CIP, SXT
Lisboa	12	+	+	+	+	D	+	+	+	+	AMX
Setúbal	58	+	-	+	-	B1	-	-	-	+	AMX, SXT
Setúbal	131	+	-	+	-	D	-	-	-	+	AMC, AMX, CIP, CXM, SXT
Setúbal	73	+	+	+	+	B2	+	+	+	+	AMX
Beja	131	-	-	+	-	B2	-	-	+	+	AMC, AMX, CXM
Lisboa	73	+	+	+	+	A	+	+	+	+	-

Legenda - AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), AMX (amoxicilina), CXM (cefuroxima), CIP (ciprofloxacina), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol).

Os isolados de origem comunitária eram oriundos de vários pontos do país tal como Lamego, Lisboa, Setúbal e Beja, encontrando-se esquematizados na tabela VIII.

Os que se destacaram por apresentarem todos os genes e ilhas de patogenicidade em estudo provinham de grupos filogenéticos distintos, e pertenciam ao ST 12 (Lisboa) e ST 73 (Setúbal e Lisboa), este último associado a estirpes de *E. coli* uropatogénica^[49, 51]. Em ambos os casos, a resistência aos antibióticos quando existente, verificou-se apenas para a amoxicilina.

Os isolados pertencentes ao ST 58, aparentemente comum em isolados de origem animal e humana^[65-66], eram oriundos de Lamego e Setúbal, pertencentes a grupos comensais (A e B1), positivos para os genes de colonização *fimH* e *ecpA*, com resistência a duas ou mais classes de antibióticos.

Dois isolados, oriundos de Setúbal e Beja correspondiam ao ST 131. Estudos relacionam este ST com grupos filogenéticos patogénicos, em especial B2, elevada virulência, resistência aos antibióticos, disseminação tanto em meio hospitalar como na comunidade, relacionando-o com estirpes produtoras de CTX-M-15^[53-55]. Efetivamente ambos os isolados pertenciam a grupos filogenéticos patogénicos (B2 e D), multirresistentes porém não produtores de CTX-M-15, nem positivos para a maioria dos genes de virulência em estudo. O isolado de Beja provinha de uma mulher grávida, sem outro tipo de fator de risco.

Nesta pequena amostra aleatória verificou-se que 29% dos isolados pertencem ao ST131, emergente e altamente patogénico.

Tabela IX – Determinação do Sequence Type (ST).

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST
6	4	4	16	24	8	14	58
13	13	9	13	16	10	9	12
6	4	4	16	24	8	14	58
53	40	47	13	36	28	29	131
36	24	9	13	17	11	25	73
53	40	47	13	36	28	29	131
36	24	9	13	17	11	25	73

3.2. Amostras hospitalares

3.2.1. Caracterização da amostra clínica

De um universo de 1246 isolados, provenientes de doentes em internamento hospitalar, foram selecionadas 50 isolados de *Escherichia coli* oriundas de infeções urinárias, provenientes de diferentes hospitais portugueses:

Lisboa e vale do Tejo: Hospital de Santa Maria (n=36), Hospital de Santo António dos Capuchos (n=4), Hospital de São Francisco Xavier (n=4), Hospital Egas Moniz (n=1), Hospital de Santa Marta (n=1), Hospital do Barreiro (n=1), Hospital Militar (n=1), Hospital SAMS (n=1).

Algarve: Hospital de Portimão (n=1).

As urinas provinham de homens e mulheres, de várias idades. Não houve acesso a informação sobre fatores de risco ou o estado do doente. Contudo, muitos dos isolados são oriundos de serviços de medicina interna e cuidados intensivos logo a probabilidade de se tratarem de doentes algaliados é elevada.

3.2.2. Genes de virulência

Na pesquisa dos genes de virulência observou-se um padrão de prevalência idêntico relativamente aos isolados estudados em cistites na comunidade, destacando-se os genes *ecpA* e *fimH*, presentes em todos os isolados (n=50), como é observado na figura IV. A prevalência de 100% destes fatores de colonização contrastou com as baixas frequências dos outros genes em estudo *papC*, *usp*, *hlyA* e *cnfI*, que se encontraram entre os 4,0% e os 24,0%.

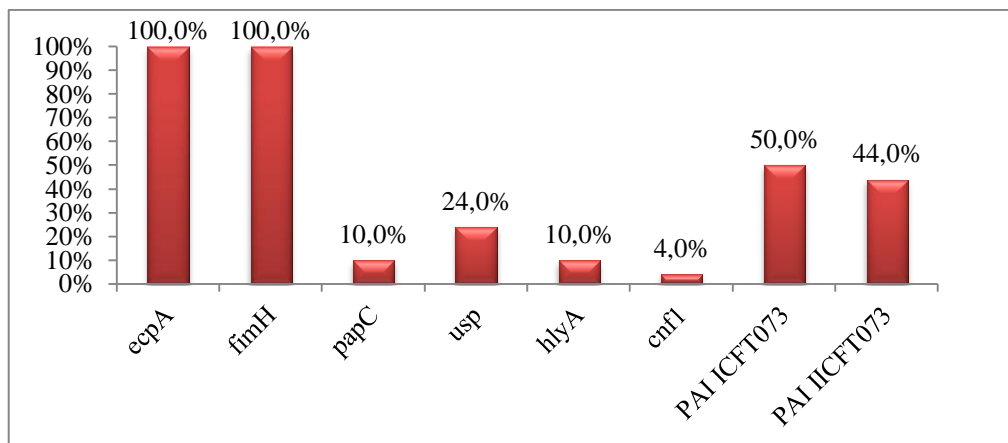


Figura V - Percentagem de isolados de *Escherichia coli*, provenientes de cistites em meio hospitalar, contendo os genes de virulência estudados *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CTF073} e PAI II_{CFT073}.

3.2.3. Relação dos fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e os grupos filogenéticos

Os 50 isolados de *E. coli* distribuíram-se, de acordo com a figura V, pelos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D, tendo sido B2 o mais prevalente. Nos grupos comensais A e B1, encontram-se 14 dos 50 isolados de ITU, ou seja 28%, sendo que A foi mais prevalente (24%; n=12) que B1 (4%; n=2). Mais uma vez, a maioria dos isolados (78%; n=36) pertenceu aos grupos patogênicos, dos quais 42% (n=21) pertenciam ao grupo B2 e 30% (n=15) ao grupo D.

Relativamente aos resultados da tabela IX, confirmou-se a predominância dos genes de colonização *fimH* e *ecpA* em todos os grupos filogenéticos, uma elevada prevalência do gene *usp* nos grupos B2 e D. Os restantes genes distribuíram-se de forma homogênea tanto no grupo comensal A como nos dois grupos patogênicos B2 e D. Relativamente ao grupo B1, apenas se verificou a presença de genes de colonização.

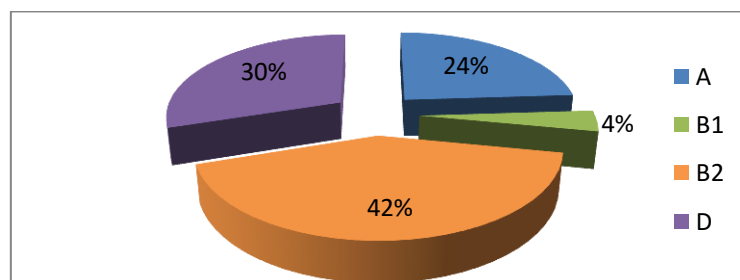


Figura VI - Distribuição dos isolados de *Escherichia coli*, provenientes de em meio hospitalar pelos grupos filogenéticos comensais (A e B1) e patogênicos (B2 e D).

Tabela X - Distribuição dos isolados hospitalares de *Escherichia coli* pelos grupos filogenéticos patogênicos (B2, D) e comensais (A, B1), de acordo com os genes de virulência *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnf1* e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}.

Genes	B2 n=21		D n=15		A n=14		B1 n=2	
<i>ecpA</i> (n=50)	21	100,0%	14	93,3%	12	100,0%	2	100,0%
<i>fimH</i> (n=50)	21	100,0%	14	93,3%	12	100,0%	2	100,0%
<i>papC</i> (n=5)	1	4,8%	1	6,7%	2	16,7%	1	50,0%
<i>usp</i> (n=12)	6	28,6%	6	40,0%	-	-	-	-
<i>hlyA</i> (n=5)	2	9,5%	1	6,7%	2	16,7%	-	-
<i>cnf1</i> (n=2)	1	4,8%	-	-	1	8,3%	-	-
PAI I _{CFT073} (n=25)	11	52,4%	12	80,0%	2	16,7%	-	-
PAI II _{CFT073} (n=22)	11	52,4%	10	66,7%	1	8,3%	-	-

3.2.4. Ilhas de Patogenicidade e grupos filogenéticos

Quanto à prevalência das ilhas de patogenicidade nos isolados hospitalares, esta representou 50,0% (n=25) para a PAI I_{CFT073} e 44,0% (n=22) para a PAI II_{CFT073} (figura IV), sendo a sua presença superior nas estirpes do grupo filogenético D (tabela IX) com valores na ordem dos 80,0% (n=12) e 66,7% (n=10), respectivamente. Comparativamente, os isolados do grupo B2 apresentaram prevalências inferiores, não se verificando diferença estatística entre os dois grupos filogenéticos.

Relativamente aos grupos comensais A e B1, a expressão das PAI foi pouco significativa, com prevalências baixas para o grupo A, não tendo sido detetadas ilhas de patogenicidade nos isolados pertencentes a B1.

3.2.5. Suscetibilidade aos Antibióticos

O estudo da suscetibilidade revelou que todos os 50 isolados apresentavam elevadas percentagens de resistências a vários grupos de antibióticos tais como os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, tal como indica a figura VI.

A resistência aos beta-lactâmicos, particularmente à ceftazidima, cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico foi muito significativa. As maiores taxas de isolados resistentes foram verificadas no caso da ceftazidima com 90% (n=45) e cefotaxima com 86% (n=43). Seguiu-se a ciprofloxacina com 76% (n=38), gentamicina com 70,0% (n=35) e amoxicilina/ácido clavulânico com 62% (n=31).

Os antibióticos com menor percentagem de resistência foram o imipenem e a cefoxitina, o primeiro com 2% (n=1) referente a um isolado produtor de uma carbapenemase KPC, e o segundo com 16% (n=8).

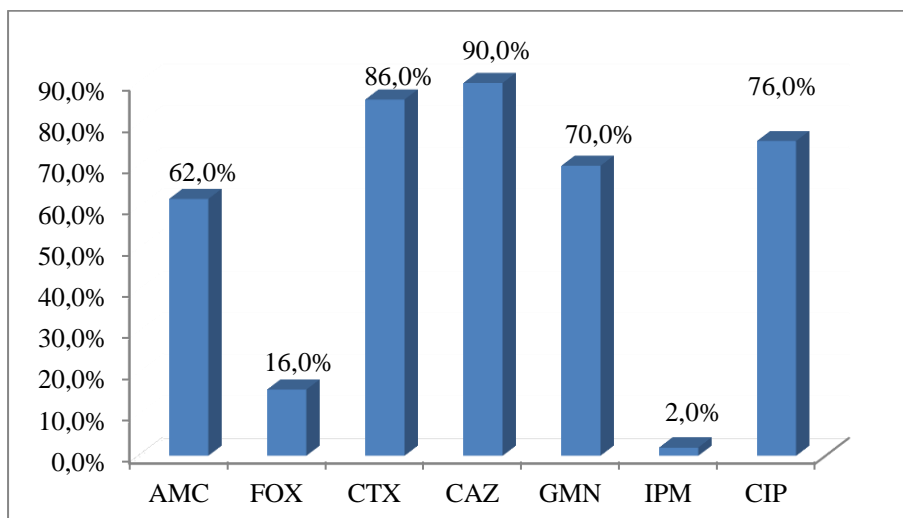


Figura VII - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), FOX (cefoxitina), CTX (cefotaxima), CAZ (ceftazidima), GMN (gentamicina), IPM (imipenem) e CIP (ciprofloxacina).

Seguidamente, em 38 isolados foi realizado o estudo da suscetibilidade aos antibióticos utilizados frequentemente na terapêutica das ITU da comunidade, dos quais a fosfomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol (figura VII). Sem surpresas verificou-se que as resistências à fosfomicina e nitrofurantoína permaneceram baixas, com 2,6% (n=1) dos isolados resistentes à nitrofurantoína e nenhum isolado resistente à fosfomicina. A percentagem de resistências observada no caso do trimetoprim-sulfametoxazol foi de 63,2% (n=24), um valor muito superior comparativamente ao observado na comunidade (figura III).

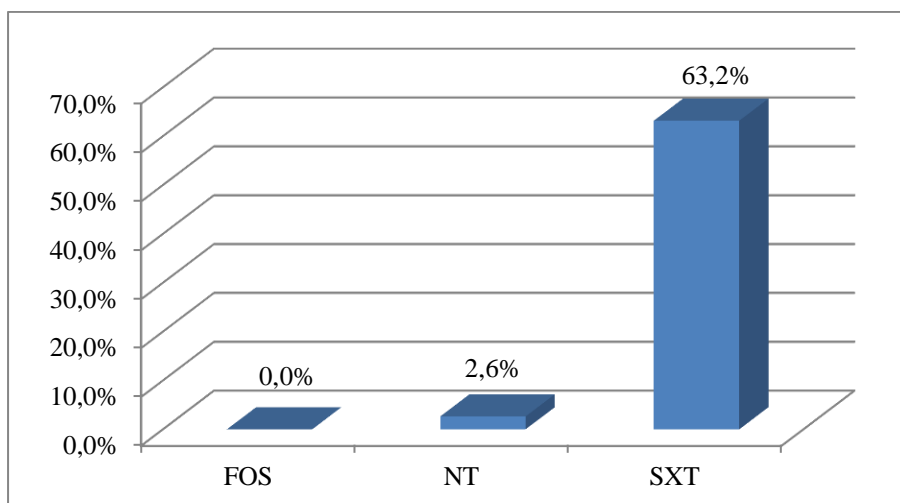


Figura VIII - Percentagem de isolados resistentes aos antibióticos FOS (fosfomicina), NT (nitrofurantoína) e SXT (trimetoprim-sulfametoxazol).

3.2.6. Caracterização dos isolados produtores de beta-lactamases

Dos 50 isolados hospitalares estudados, todos eram produtoras de beta-lactamases. As beta-lactamases de espectro restrito apresentaram-se em apenas 2% (n=1), representadas por um isolado que apresentava uma TEM-1. Também 2% (n=1) apresentou uma cefalosporinase AmpC.

Relativamente às beta-lactamases de espectro alargado, 6% (n=3) codificavam para TEM-52 (n=2) e TEM-26 (n=1). As mais representativas neste estudo foram as ESBL CTX-M, pelo que 42 dos isolados (84,0%) eram positivos para o gene *bla*_{CTX-M}, datando o primeiro isolado de Novembro de 2000.

Ao caracterizar a distribuição dos 45 isolados produtores de ESBL pelos diferentes grupos filogenéticos verificou-se que 44,4% (n=20) pertenciam ao grupo B2, 31,1% (n=14) ao grupo D e 24,4% (n=11) ao grupo A. Apenas 6% dos isolados (n=3) eram produtores da carbapenemase KPC-3 (n=2) e KPC-2 (n=1). Estes isolados são os mais recentes do estudo, ao que o primeiro data de 06/2011.

Voltando novamente aos isolados positivos para o gene *bla*_{CTX-M}, o perfil fenotípico de resistência aos vários antibióticos, isto é, a elevada resistência à ceftazidima, cefotaxima, gentamicina, ciprofloxacina e suscetibilidade à cefoxitina partilhada pelos

restantes isolados sugere a presença da enzima CTX-M-15. Dado que pelo método de caracterização molecular M13-PCR *fingerprinting* se verificou uma similaridade do perfil electroforético, a sequenciação não foi efetuada na totalidade dos isolados em que foi detetado o gene *bla_{CTXM}*. Das 29 sequências analisadas, em 22 foi identificada a enzima CTX-M-15, sendo também detetadas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-2 type, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-35. As estirpes produtoras de CTX-M-15 distribuíram-se maioritariamente pelos grupos filogenéticos B2 e D, 63,6% (n=14) e 31,8% (n=7) respetivamente. Apenas 4,5% (n=1) pertenceu ao grupo A.

Foram encontradas estirpes produtoras de CTX-M-15 em toda a extensão geográfica em estudo (área metropolitana de Lisboa e vale do Tejo e Portimão) com a exceção do Hospital do Barreiro.

Nesta pequena amostra, e tendo em conta os isolados oriundos do Hospital Santa Maria, parece que a evolução aconteceu dos serviços de medicina interna (de 11/2000 a 05/2003) para outros serviços como patologia cirúrgica (06/2003), até que a partir de 2005 se verificou em isolados da ortopedia, nefrologia e cirurgia, e daí para outros serviços até à atualidade.

3.3. M13-PCR *fingerprinting*

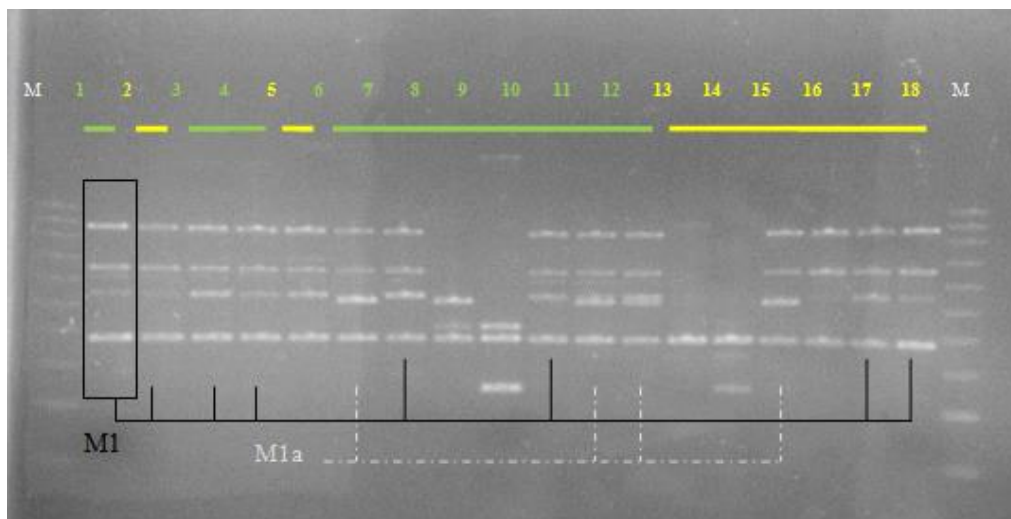


Figura IX - Perfis de M13-PCR *fingerprinting*. As amostras representadas a verde são de origem hospitalar, as amarelas são de origem comunitária. M é o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (Nzytech). O perfil M1 foi o predominante.

Os isolados nos quais foi realizada a técnica de M13-PCR *fingerprinting* são de origem hospitalar e comunitária, tendo em comum serem isolados multirresistentes, produtores de CTX-M-15.

O principal perfil genotípico foi o M1, como indica a figura VIII, repetido por mais sete isolados (2, 3, 4, 7, 10, 17 e 18), todos de origens distintas. O mesmo aconteceu com o segundo perfil mais frequente, M1a, correspondente a três isolados pertencentes a hospitais distintos (por ordem, H. de Egas Moniz, H. Santa Marta e H. Santo António dos Capuchos) e um isolado da comunidade (Sintra).

3.4. Detecção do clone O25b-ST131

Dos 40 isolados da comunidade 35,0% (n=14) eram positivos para o clone O25b-ST131, sendo que 92,9% dos mesmos (n=13) apresentaram elevada prevalência de fatores de virulência e PAIs em estudo. Segundo o ensaio, este clone foi encontrado de Norte a Sul do país, destacando-se no Porto (n=5).

Neste grupo contemplou-se também um dos sete isolados anteriormente estudados pela técnica de MLST, mais propriamente o isolado B2 de ST131. O resultado foi negativo para o alelo específico do clone em estudo, sugerindo que embora seja pertencente ao ST131, não se trate de um isolado do serogrupo O25b. O ensaio foi considerado válido pois 97,5% dos isolados (n=39) apresentaram o controlo positivo.

Relativamente ao grupo de isolados produtores de CTX-M-15, 80,0% (n=32) correspondiam ao clone O25b-ST131 oriundos maioritariamente do Hospital Santa Maria (n=17), mas também do H. Sto António dos Capuchos (n=3), H. S. Francisco Xavier (n=2), H. de Portimão (n=1) e H. Militar (n=1). Nos isolados multirresistentes da comunidade, verificou-se mais uma vez a sua disseminação de Norte a Sul do país.

Como já referido, O25b-ST131 trata-se de um clone emergente, com elevada patogenicidade, disseminado globalmente e relacionado com a produção e disseminação de CTX-M-15^[39, 42]. Clermont *et al*^[55] refere ainda que o clone faz parte do grupo filogenético B2. Verificou-se que em 32 isolados positivos 8 pertenciam a outros grupos filogenéticos sendo D (n=5) o maioritário, pelo que a amplificação do alelo *pabB* não se mostrou específico para o grupo B2 como previsto.

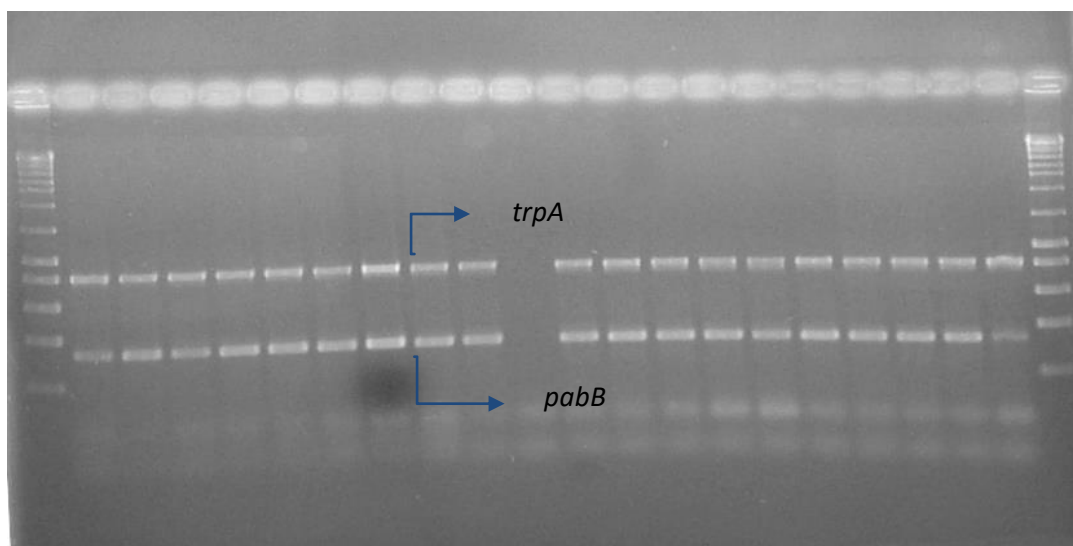


Figura IX – Detecção do clone O25b-ST131 no grupo de isolados produtores de CTX-M-15. Genes *trpA* (785 pb) e *pabB* (347pb), marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (Nzytech).

4. Discussão e Conclusões

Este trabalho teve como objetivo comparar dois grupos de isolados de *E. coli* provenientes de urinas da comunidade e hospital. O primeiro grupo teve em atenção a diversidade de origens de isolados oriundos da comunidade que contemplou Setúbal, Beja, Sintra, Lisboa, Évora, Albufeira, Caldas da Rainha, Leiria, Porto e Lamego, e caracterizou-se pela elevada suscetibilidade aos antibióticos. No segundo grupo, onde se incluíram os isolados do hospital e alguns isolados da comunidade, a característica comum foi a produção de ESBLs.

Um dos fatores principais para a ocorrência de infeções do trato urinário é a presença de adesinas fimbriais, permitindo a aderência da bactéria ao uroepitélio. A maior prevalência de fímbrias do tipo I, comparativamente às do tipo P, é um indicador de virulência importante e relevante na patogenicidade das estirpes de *E. coli*. Estas fímbrias tipo I desempenham um papel importante na indução da inflamação, em particular nas cistites, uma vez que a adesina FimH se liga especificamente à uroplaquina, abundante no epitélio vesical. Embora, neste estudo, a associação das duas fímbrias (tipo I e tipo P) não tenha sido significativa, pode alertar para a necessidade de um maior acompanhamento clínico de modo a evitar infeções no aparelho urinário alto, mais concretamente, pielonefrites.

O facto de na maioria dos isolados se ter verificado a presença do *pilus* ECP, o qual está implicado na colonização do intestino, contribuindo para a permanência das bactérias no hospedeiro, veio confirmar que a contaminação por via ascendente é a principal causa de ITU. Inclusivamente EcpA é um fator crítico para a aderência e virulência de estirpes de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), porque ao mimetizar o comportamento das estirpes comensais confere a vantagem na colonização e evasão ao sistema imunitário do hospedeiro^[18]. Neste estudo, a prevalência do gene *ecpA*, tanto nos grupos patogénicos (B2 e D) como comensais (A e B1), permitiu concordar com Rendon *et al*^[18], afirmando que este gene terá sido conservado durante a evolução de *E. coli* intestinais e extraintestinais, permitindo um mecanismo de colonização generalizado. Efetivamente, o gene *ecpA* está presente de forma homogénea nos isolados dos quatro grupos filogenéticos.

Relativamente à associação do grupo filogenético e fatores de virulência, observou-se um predomínio destes nos grupos patogénicos B2 seguido do grupo D, tanto em cistites complicadas como não complicadas, comparativamente aos grupos comensais A e B1. Esta diferença é evidenciada pela baixa percentagem dos genes *usp*, *hlyA* e *cnfI* encontrados nestes grupos, o que poderá justificar uma menor capacidade invasiva e uma menor causalidade para a infeção por parte das estirpes comensais. A proteína USP tem sido encontrada mais frequentemente em estirpes uropatogénicas do que em comensais e está associada a bacteremia com origem nas infeções urinárias [12]. Relativamente à comunidade, o gene *usp* foi detetado nas estirpes patogénicas provenientes de cistites complicadas (cITU), tendo sido curiosamente encontrado apenas nos isolados de cistites não complicadas nas estirpes comensais. Se a prevalência de uma proteína com capacidade invasiva, num grupo de isolados patogénicos é relevante, a presença desta proteína USP nos isolados comensais, em particular nos provenientes de ncITU, poderá ser um alerta pela patogenicidade que confere à bactéria, independentemente dos fatores de risco inerentes ao hospedeiro. No entanto, os isolados de cITU apresentaram percentagens elevadas de fatores de virulência, um pouco superiores aos isolados de ncITU, o que permitiu estabelecer um grau de patogenicidade semelhante entre os grupos, reforçando a hipótese de que a virulência inerente à bactéria poderá ser tão ou mais importante que os fatores de risco do hospedeiro. Efetivamente a presença de fatores de aderência, de invasão e de toxicidade em estirpes comensais, características inerentes à estirpe bacteriana, tem um papel determinante e justifica a dificuldade de erradicação da bactéria e da recorrência de infeção.

Ainda na comunidade, a prevalência das ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} foi superior nos isolados patogénicos comparativamente aos comensais, sendo que neste grupo não foram detetadas nos isolados de cITU. Estatisticamente, a PAI I_{CFT073} mostrou-se mais prevalente no grupo B2 que no grupo D, seguida pelos grupos comensais A e B1. No caso da PAI II_{CFT073} apenas se verificou que a prevalência era superior no grupo patogénico B2 comparativamente aos restantes. Estas ilhas de patogenicidade possuem um grupo de genes que codificam para a fímbria do tipo P e α -hemolisina, o que poderá indiciar a maior facilidade das estirpes atingirem o aparelho urinário superior e permaneceram no parênquima renal (fímbrias do tipo P); maior capacidade de lise de hemácias (α -hemolisina), assim como células endoteliais e do

epitélio renal, permitindo maior facilidade de entrada na corrente sanguínea originando bacteremia. Neste estudo não se verificou uma associação entre o número de isolados positivos para o gene *hlyA* e a PAI I_{CFT073}. Dado que para a detecção da PAI, a zona a amplificar por PCR não contempla o gene *hlyA*, e o facto de poder ocorrer deleções, mutações e rearranjos genómicos nas PAIs poderá justificar a inexistência de concordância entre estes valores. No entanto e de acordo com Schmidt *et al*^[25], a inserção de uma PAI no cromossoma bacteriano pode converter uma bactéria não patogénica em patogénica e permitir mais facilmente a aquisição de genes de virulência. As bactérias que transportam ilhas de patogenicidade têm maior capacidade invasiva, o que associado a fatores de aderência leva a uma maior capacidade de lesão do epitélio, persistência no local, proteção do alcance do antibiótico e sistema imunitário, assim como maior capacidade de ascensão no trato urinário.

No que diz respeito à resistência aos antibióticos, a fosfomicina poderá ser o antibiótico de eleição, confirmando-se a elevada resistência apresentada pelos isolados à ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, o que constitui uma preocupação e um alerta quando existe necessidade de prescrever empiricamente.

Não é recente o interesse de muitos autores pelo estudo da relação entre a resistência aos antibióticos e virulência, que é amplamente explorado relativamente à resistência à ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol. Alguns autores relatam a existência de diminuição da virulência em estirpes de *E. coli* resistentes aos antibióticos^[55-56]. Na comunidade não houve diminuição no número de fatores de virulência em isolados resistentes aos antibióticos e não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de fatores de virulência entre as estirpes sensíveis e resistentes.

Os mesmos autores também afirmam que ocorre uma alteração no grupo filogenético predominante em isolados resistentes à ciprofloxacina^[55-57], dando-se um desvio para grupos não-B2. Mais uma vez, neste estudo não houve alterações na filogenia dos isolados associados à resistência à ciprofloxacina, uma vez que estes foram identificados como pertencentes a grupos filogenéticos patogénicos B2 e D, tanto na comunidade como em meio hospitalar. Na comunidade, este desvio verificou-se em isolados resistentes a SXT-CIP e AMX-CIP, o que chamou a atenção para a importância de analisar a suscetibilidade a outros antibióticos que não só a ciprofloxacina. Um olhar mais atento, mais concretamente através da análise por antibiótipo, levou à conclusão de

que os isolados resistentes à amoxicilina provavelmente possuem uma beta-lactamase de espectro restrito. A análise da suscetibilidade aos antibióticos isoladamente poderá induzir a erros na tentativa de estabelecimento de relação entre fatores de virulência em estirpes sensíveis a um dado antibiótico comparativamente a estirpes resistentes, assim como a relação entre um dado grupo filogenético e uma resistência específica a um determinado antibiótico.

A discriminação por antibiótipo e virulência dos isolados da comunidade permitiu reforçar que a UPEC terá, como principais componentes facilitadores em cistite não complicada, os fatores de colonização *versus* os fatores de invasão, não sendo as estirpes mais resistentes as principais responsáveis por essa condição. Esses dados alertam para os fatores de risco associados com o hospedeiro e, no caso da ITU da mulher, para a proximidade da uretra e região perianal, tendo em conta os valores encontrados para o gene *ecpA* relacionado com a colonização do trato gastrointestinal, e *fimH* com a sua afinidade para o epitélio vesical.

Neste estudo foi também possível demonstrar que as fímbrias do tipo P não foram apenas encontradas em isolados resistentes aos antibióticos^[67], existindo também uma relação, e em maior número, com os isolados sensíveis, indiciando a capacidade de ascender no trato urinário, originar uma pielonefrite e facilitar a disseminação generalizada para uma infecção mais grave como sépsis^[68].

Relativamente ao MLST realizado, em 7 isolados da comunidade verificou-se que 29% pertenciam ao ST 131, do qual faz parte um clone emergente mundialmente, considerado altamente patogénico^[30, 69-70]. Estes resultados podem ser um indicador da sua rápida disseminação e alertar para a possibilidade de se tornar um problema de saúde pública. Um dos isolados apresentou resistência a várias classes de antibióticos, no outro caso apenas aos beta-lactâmicos. Contudo em ambos não foram detetadas beta-lactamases do tipo CTX-M, acrescentando ainda uma prevalência pouco significativa dos fatores de virulência em estudo. Tendo em conta que este clone está associado ao gene *bla_{ctx-m-15}* poder-se-á inferir que estas bactérias podem não ter adquirido o gene, que normalmente está associado a um plasmídeo.

Nos isolados provenientes do meio hospitalar, verificou-se o predomínio dos grupos filogenéticos patogénicos B2 e D, concordante com a realidade comunitária. Observou-se ainda uma total prevalência dos genes de colonização *ecpA* e *fimH* tanto em grupos

comensais como patogénicos, uma relação entre o gene *usp* e os grupos B2 e D (não verificado em isolados da comunidade) e uma distribuição homogénea dos restantes genes de virulência no grupo comensal A e grupos patogénicos B2 e D. Estes dados demonstram a contribuição fundamental dos genes de colonização para uma maior virulência da *E. coli* uropatogénica em meio hospitalar. Como observado, os isolados hospitalares não têm uma tão elevada prevalência de todos os genes de virulência em estudo como os da comunidade. Pelo contrário, verificou-se uma ligeira diminuição na presença dos genes *papC*, *hlyA* e *cnf1*. A resistência aos antibióticos, devida à disseminação de ESBLs do tipo CTX-M neste grupo, confere vantagem aos isolados que as adquirem, pelo que atrasam o estabelecimento de uma terapia adequada, dificultando o tratamento e levando ao aumento do uso de antibióticos de última linha como os carbapenemos.

Os internamentos são fatores decisivos no que toca à aquisição de infeções provocadas por bactérias multirresistentes, assim como à colonização dos doentes pelas mesmas. A fragilidade em que o sistema imunitário do hospedeiro se encontra e a algaliação são fatores de risco decisivos na ITU hospitalar. O controlo de uma flora extraintestinal patogénica, como é o caso das *E. coli* uropatogénicas do grupo B2 e D, deixa de ser adequadamente feito, estabelecendo-se infeções que em outras circunstâncias poderiam não acontecer. O que se verificou foi que o grupo de 50 isolados hospitalares de elevada patogenicidade se caracterizou pela associação de estirpes multirresistentes a adesinas como EcpA e FimH, que contribuíram para a aquisição da capacidade de colonização intestinal, produção de biofilme em superfícies abióticas e aderência ao uroepitélio, assim como a considerável prevalência de PAIs, que asseguraram as capacidades invasivas dos isolados.

A situação torna-se particularmente sensível quando estas estirpes multirresistentes estão associadas a grupos filogenéticos comensais. Dos 24% (n=12) de isolados pertencentes ao grupo A, 11 eram produtores de ESBL, e dos dois isolados incluídos no grupo B1, um expressava uma carbapenemase KPC-3. As estirpes dos grupos comensais têm vantagem adaptativa em relação às estirpes dos grupos patogénicos porque, para além de possuírem fatores de virulência que lhes permitem causar infeção, têm mecanismos de evasão ao sistema imunitário^[35] por serem reconhecidas pelo hospedeiro como estirpes comensais.

A resistência aos antibióticos verificada nos isolados hospitalares é o reflexo da ação das beta-lactamases mais prevalentes. Em geral, as ESBL são codificadas por genes localizados em plasmídeos e são caracterizadas pela sua capacidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira e quarta geração) e monobactams, mas não cefamicinas como a cefoxitina e carbapenems. São geralmente suscetíveis aos inibidores beta-lactâmicos tais como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam^[71]. A resistência aos beta-lactâmicos está muitas vezes associada à resistência a antibióticos de outras classes, também muito utilizados na terapêutica, nomeadamente aminoglicosídeos e fluoroquinolonas^[35]. Neste estudo verificou-se uma elevada taxa de resistências relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos mas também à amoxicilina/ácido clavulânico, à gentamicina e à ciprofloxacina. Os isolados resistentes ao imipenem são produtores de carbapenemases (KPC-2 e KPC-3), verificando-se mais uma vez excelentes resultados relativamente à fosfomicina e nitrofurantoína.

Foram encontradas estirpes produtoras de CTX-M-15 em toda a extensão geográfica em estudo, o que consistiu da área metropolitana de Lisboa e vale do Tejo, e Portimão, sendo que os isolados comunitários que codificaram para o gene *bla*_{CTX-M}, utilizados no ensaio de M13-PCR *fingerprinting*, mostraram-se disseminados a nível nacional.

A disseminação do clone pandémico O25b-ST131 associado à ESBL CTX-M-15 permitiu que rapidamente a resistência às cefalosporinas de terceira geração fosse dominante a nível mundial^[34]. Neste estudo, a deteção do clone O25b-ST131 destacou-se nos isolados da comunidade em 35,0% (n=14) dos casos, sendo predominante na área do Porto. Nos isolados de origem hospitalar a prevalência foi superior chegando aos 80,0% (n=32), com principal foco no hospital de Santa Maria. Verificou-se neste último grupo, contendo isolados de vários grupos filogenéticos, que a amplificação do alelo *pabB* não foi específica para os isolados do grupo B2 como seria de esperar, tendo sido amplificado em oito isolados não-B2.

Oito estirpes da comunidade foram englobadas no grupo das estirpes hospitalares porque eram produtoras de CTX-M-15, e provinham de vários pontos do País, variando as idades dos doentes entre os 58 e os 86 anos. Efetivamente, e de acordo com as suas características fenotípicas e genotípicas poder-se-á afirmar que estes doentes constituem o reservatório deste clone universal.

Este estudo confirmou que as ITU da mulher aparentemente sem fatores de risco na comunidade, e as ITU hospitalares estão na sua maioria associadas a isolados pertencentes aos grupos filogenéticos patogénicos.

Foi possível verificar a existência de uma relação entre o grupo B2 e as citotoxinas α -hemolisina, CNF e ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}, que representam ferramentas importantes para a virulência dos isolados de *E. coli*.

Foi confirmada a existência de virulência associada a estirpes sensíveis aos antibióticos normalmente recomendados em terapêutica empírica.

A disseminação geográfica do clone O25b-ST131 não associado a ESBL do tipo CTX-M verificou-se mais significativamente nos isolados da comunidade, enquanto associado a CTX-M-15 se verificou disseminado a nível nacional, em ambos os isolados do meio hospitalar e comunitário, confirmando a emergência pandémica deste clone.

5. Referências Bibliográficas

1. **Grabe, M., R. Bartoletti, T.E. Bjerklund Johansen, T. Cai, M. Çek, B. Köves, K.G. Naber, .S. Pickard, P. Tenke, F. Wagenlehner, B. Wullt** (2015). *Guidelines on Urological Infections*. European Association of Urology, http://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.pdf último acesso a 17/12/2015
2. **Mulvey, M.A.** (2002). *Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol., **4**(5): p. 257-71.
3. **Foxman, B.** (2010). *The epidemiology of urinary tract infection*. Nat Rev Urol, **7**(12): p. 653-60.
4. **Kaper, J.B., J.P. Nataro, H.L. Mobley** (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol., **2**(2): p. 123-40.
5. McMaster Pathophysiology Review, <http://www.pathophys.org/uti/>, último acesso a 13/10/2015.
6. **Schmiemann, G., E. Kniehl, K. Gebhardt, M. M. Matejczyk, E. Hummers-Pradier** (2010). *The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review*. Dtsch Arztebl Int, **107**(21): p. 361-7.
7. **Katsarolis, I., G. Poulakou, S. Athanasia, J. Kourea-Kremastinou, N. Lambri, E. Karaiskos, P. Panagopoulos, F. V. Kontopidou, D. Voutsinas, G. Koratzanis, M. Kanellopoulou, G. Adamis, H. Vagiakou, P. Perdikaki, H. Giamarellou, K. Kanellakopoulou** (2010). *Acute uncomplicated cystitis: from surveillance data to a rationale for empirical treatment*. Int J Antimicrob Agents, **35**(1): p. 62-7.
8. **Hooton, T.M.** (2000). *Pathogenesis of urinary tract infections: an update*. J Antimicrob Chemother, **46 Suppl 1**: p. 1-7; discussion 63-5.
9. **Chung, A., M. Arianayagam, P. Rashid** (2010). *Bacterial cystitis in women*. Aust Fam Physician, **39**(5): p. 295-8.
10. **Wiles, T.J., R.R. Kulesus, M.A. Mulvey** (2008). *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli*. Exp Mol Pathol, **85**(1): p. 11-9.
11. **Holden, N. J., M. Totsika, E. Mahler, A.J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt, D. L. Gally** (2006). *Demonstration of regulatory cross-talk between P*

- fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli*. Microbiology, **152**(Pt 4): p. 1143-53.
12. Wellens, A., C. Garofalo, H. Nguyen, N. Van Gerven, R. Slattegard, J. P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. De Greve, S. Hultgren, J. Bouckaert (2008). *Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex*. PLoS One, **3**(4): p. e2040.
 13. Hung, C. S., J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Augustine, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren (2002). *Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection*. Mol Microbiol, **44**(4): p. 903-15.
 14. Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton, S. J. Hultgren (2004). *Intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis*. Trends Microbiol, **12**(9): p. 424-30.
 15. Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockatell, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, R. A. Welch , H. L. Mobley (2005). *Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, **73**(11): p. 7588-96.
 16. Sauer, F.G., M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Waksman, S. J. Hultgren (2000). *Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment*. Curr Opin Struct Biol. **10**(5): p. 548-56.
 17. Antao, E.M., L.H. Wieler, C. Ewers (2009). *Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. Gut Pathog, **1**(1): p. 22.
 18. Rendon, M. A., Z. Saldana, A. L. Erdem, V. Monteiro-Neto, A. Vazquez, J. B. Kaper, J. L. Puente, J. A. Giron (2007). *Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization*. Proc Natl Acad Sci U S A, **104**(25): p. 10637-42.
 19. Blackburn, D., A. Husband, Z. Saldana, R. A. Nada, J. Klena, F. Qadri, J. A. Giron (2009). *Distribution of the Escherichia coli common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic E. coli*. J Clin Microbiol, **47**(6): p. 1781-4.
 20. Rijavec, M., M. Muller-Premru, B. Zakotnik, D. Zgur-Bertok (2008). *Virulence factors and biofilm production among Escherichia coli strains causing bacteraemia of urinary tract origin*. J Med Microbiol, **57**(Pt 11): p. 1329-34.

21. **Yamamoto, S., M. Nakano, A. Terai, K. Yuri, K. Nakata, G. B. Nair, H. Kurazono, O. Ogawa** (2001). *The presence of the virulence island containing the usp gene in uropathogenic Escherichia coli is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model.* J Urol, **165**(4): p. 1347-51.
22. **Crnigoj, M. Z. Podlesek, M. Budic, D. Zgur-Bertok** (2014). *The Escherichia coli uropathogenic-specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid -binding activity.* BMC Microbiol, **14**: p. 16.
23. **Oelschlaeger, T.A., U. Dobrindt, J. Hacker** (2002). *Pathogenicity islands of uropathogenic E. coli and the evolution of virulence.* Int J Antimicrob Agents, **19**(6): p. 517-21.
24. **Emody, L., M. Kerenyi, G. Nagy** (2003). *Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli.* Int J Antimicrob Agents, **22 Suppl 2**: p. 29-33.
25. **Schmidt, H., M. Hensel** (2004). *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis.* Clin Microbiol Rev, **17**(1): p. 14-56.
26. **Clermont, O., S. Bonacorsi, E. Bingen** (2000). *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group.* Appl Environ Microbiol, **66**(10): p. 4555-8.
27. **Johnson, J.R., T. T. O'Bryan, M. Kuskowski, J. N. Maslow** (2001). *Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among Escherichia coli blood isolates from patients with diverse-source bacteremia.* Infect Immun, **69**(9): p. 5363-74.
28. **Galatti, L., A. Sessa, G. Mazzaglia, S. Pecchioli, A. Rossi, C. Cricelli, G. C. Schito, G. Nicoletti, A. P. Caputi** (2006). *Antibiotic prescribing for acute and recurrent cystitis in primary care: a 4 year descriptive study.* J Antimicrob Chemother, **57**(3): p. 551-6.
29. **Gupta, K., D. Scholes, and W.E. Stamm** (1999). *Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women.* JAMA, **281**(8): p. 736-8.
30. **Vimont, S., A. Boyd, A. Bleibtreu, M. Bens, J. M. Goujon, L. Garry, O. Clermont, E. Denamur, G. Arlet, A. Vandewalle** (2012). *The CTX-M-15-producing Escherichia coli clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities.* PLoS One, **7**(9): p. e46547.

31. **Narciso A., F.Fonseca, S. Arriaga Cerqueira, A. Duarte** (2011), *Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010*. *Acta Urológica*, **28**(1).
32. **Karageorgopoulos, D.E., R. Wang, X. H. Yu, M. E. Falagas** (2012). *Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens*. *J Antimicrob Chemother*, **67**(2): p. 255-68.
33. **McOsker, C.C., P.M. Fitzpatrick** (1994). *Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens*. *J Antimicrob Chemother*, **33 Suppl A**: p. 23-30.
34. **European Centre for Disease Prevention and Control**. (2014), *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013, Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. ECDC: Stockholm, <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>, último acesso a 13/10/2015
35. **Narciso A., L. Lito, J.M. Cristino, A. Duarte** (2010). *Escherichia coli Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos Versus Factores de Virulência*. *Acta Urológica*, **27**(2): p. 11-20.
36. **Brizio, A. S. V., A. R. Goncalves, L. M. Lito, J. M. Cristino, M. J. Salgado, A. Duarte** (2006). *Survey of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the blaCTX-M-9 gene*. *Int J Antimicrob Agents*, **28**(4): p. 320-4.
37. **Barroso, H., A. Freitas-Vieira, and A. Duarte** (1999). *Molecular characterization of a ceftazidime-resistant Morganella morganii isolate producing a TEM-10 beta-lactamase*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**(2): p. 434-5.
38. **Barroso, H., A. Freitas-Vieira, L. M. Lito, J. M. Cristino, M. J. Salgado, H. F. Neto, J. C. Sousa, G. Soveral, T. Moura, A. Duarte** (2000). *Survey of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme*. *J Antimicrob Chemother*, **45**(5): p. 611-6.
39. **Coque, T.M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Canton, P. Nordmann** (2008). *Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15*. *Emerg Infect Dis*, **14**(2): p. 195-200.

40. **Pitout, J.D. and K.B. Laupland** (2008). *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern*. Lancet Infect Dis, **8**(3): p. 159-66.
41. **Karim, A., L. Poirel, S. Nagarajan, P. Nordmann** (2001). *Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1*. FEMS Microbiol Lett, **201**(2): p. 237-41.
42. **Nicolas-Chanoine, M.H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Canica, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout, J. R. Johnson** (2008). *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15*. J Antimicrob Chemother, **61**(2): p. 273-81.
43. **Conceicao, T., A. Brizio, A. Duarte, L. M. Lito, J. M. Cristino, M. J. Salgado** (2005). *First description of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae in Portugal*. Antimicrob Agents Chemother, **49**(1): p. 477-8.
44. **European Centre for Disease Prevention and Control** (2015). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>, último acesso a 01/12/2015.
45. **Park, C.H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, D. C. Hooper** (2006). *Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, **50**(11): p. 3953-5.
46. **Ruiz, E., Y. Saenz, M. Zarazaga, R. Rocha-Gracia, L. Martinez-Martinez, G. Arlet, C. Torres** (2012). *qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and Klebsiella spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location*. J Antimicrob Chemother, **67**(4): p. 886-97.
47. **Fabrega, A., S. Madurga, E. Giralt, J. Vila** (2009). *Mechanism of action of and resistance to quinolones*. Microb Biotechnol, **2**(1): p. 40-61.
48. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, G.A. Jacoby** (1998). *Quinolone resistance from a transferable plasmid*. Lancet, **351**(9105): p. 797-9.
49. **Tartof, S.Y., O. D. Solberg, A. R. Manges, L. W. Riley** (2005). *Analysis of a uropathogenic Escherichia coli clonal group by multilocus sequence typing*. J Clin Microbiol, **43**(12): p. 5860-4.

50. **Enright, M.C., B.G. Spratt** (1999). *Multilocus sequence typing*. Trends Microbiol, **7**(12): p. 482-7.
51. **Lau, S.H. S. Reddy, J. Cheesbrough, F. J. Bolton, G. Willshaw, T. Cheasty, A. J. Fox, M. Upton** (2008). *Major uropathogenic Escherichia coli strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing*. J Clin Microbiol, **46**(3): p. 1076-80.
52. **Croxall, G., J. Hale, V. Weston, G. Manning, P. Cheetham, M. Achtman, A. McNally** (2011). *Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings*. J Antimicrob Chemother, **66**(11): p. 2501-8.
53. **Totsika, M., S. A. Beatson, S. Sarkar, M. D. Phan, N. K. Petty, N. Bachmann, M. Szubert, H. E. Sidjabat, D. L. Paterson, M. Upton, M. A. Schembri** (2011). *Insights into a multidrug resistant Escherichia coli pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms*. PLoS One, **6**(10): p. e26578.
54. **Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, and D.L. Paterson** (2011), *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain*. J Antimicrob Chemother, **66**(1): p. 1-14.
55. **Clermont, O., H. Dhanji, M. Upton, T. Gibreel, A. Fox, D. Boyd, M. R. Mulvey, P. Nordmann, E. Ruppe, J. L. Sarthou, T. Frank, S. Vimont, G. Arlet, C. Branger, N. Woodford, E. Denamur** (2009). *Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains*. J Antimicrob Chemother, **64**(2): p. 274-7.
56. **Rasko, D.A., J. A. Phillips, X. Li, H. L. Mobley** (2001). *Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic Escherichia coli CFT073: probes specific for uropathogenic populations*. J Infect Dis, **184**(8): p. 1041-9.
57. **Usein, C.R., M. Damian, D. Tatu-Chitoiu, C. Capusa, R. Fagaras, D. Tudorache, M. Nica, C. Le Bouguenec** (2001). *Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases*. J Cell Mol Med, **5**(3): p. 303-10.

58. **Kao, J.S., D. M. Stucker, J. W. Warren, H.L. Mobley** (1997). *Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic Escherichia coli CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains*. Infect Immun, **65**(7): p. 2812-20.
59. **Kurazono, H., S. Yamamoto, M. Nakano, G. B. Nair, A. Terai, W. Chaicumpa, H. Hayashi** (2000). *Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic Escherichia coli possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein*. Microb Pathog, **28**(3): p. 183-9.
60. **Marklund, B.I., J. M. Tennent, E. Garcia, A. Hamers, M. Baga, F. Lindberg, W. Gaastra, S. Normark** (1992). *Horizontal gene transfer of the Escherichia coli pap and prs pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties*. Mol Microbiol. **6**(16): p. 2225-42
61. **NCBI**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. último acesso a 20/09/15
62. **Grundmann, H.J., K. J. Towner, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, M. Maher, H. Seifert, M. Vaneechoutte** (1997). *Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol, **35**(12): p. 3071-7.
63. **MLST Database at UoW**, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>. último acesso a 07/07/15
64. **Instituto Pasteur**, http://bigsdh.web.pasteur.fr/ecoli/primers_used.html. último acesso a 05/07/15
65. **Ben Sallem, R., K. Ben Slama, V. Estepa, A. Jouini, H. Gharsa, N. Klibi, Y. Saenz, F. Ruiz-Larrea, A. Boudabous, C. Torres** (2012). *Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolates in healthy volunteers in Tunisia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **31**(7): p. 1511-6.
66. **Blaak, H., R. A. Hamidjaja, A. H. van Hoek, L. de Heer, A. M. de Roda Husman, F. M. Schets** (2014). *Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli on flies at poultry farms*. Appl Environ Microbiol, **80**(1): p. 239-46.
67. **Idress, M., U. Mussarat, Y. Badshah, R. Qamar, H. Bokhari** (2010). *Virulence factors profile of drug-resistant Escherichia coli isolates from urinary tract infections in Punjab, Pakistan*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **29**(12): p. 1533-7.

68. **Ramos, N. L.M. L.Saayman, T. A.Chapman, J. R.Tucker, H. V. Smith, J. Faoagali, J. C. Chin, A. Brauner, M. Katouli** (2010). *Genetic relatedness and virulence gene profiles of Escherichia coli strains isolated from septicemic and uroseptic patients*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **29**(1): p. 15-23.
69. **Zhong, Y.M., W. E. Liu, X. H. Liang, Y. M. Li, Z. J. Jian, P. M. Hawkey** (2015). *Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing Escherichia coli in healthy individuals in Hunan Province, China*. J Antimicrob Chemother, **70**(8): p. 2223-7.
70. **Sherchan, J.B., K. Hayakawa, T. Miyoshi-Akiyama, N. Ohmagari, T. Kirikae, M. Nagamatsu, M. Tojo, H. Ohara, J. B. Sherchand, S. Tandukar** (2015). *Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648*. Antimicrob Agents Chemother, **59**(6): p. 3424-32.
71. **Canton, R., J.M. Gonzalez-Alba, and J.C. Galan** (2012). *CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion*. Front Microbiol, **3**: p. 110.

6. Anexo I

Técnica de *Boiled*

O DNA utilizado em todos os métodos foi extraído pela técnica de boiled consistindo na desnaturação proteica por calor de uma suspensão bacteriana consistente (de volume 1 ml) a 95°C durante 10 minutos, seguida de centrifugação a 12 000 rpm durante 2 minutos, conservando-se o sobrenadante à temperatura de -20°C.

Condições de PCR

Tabela 11- Pesquisa dos genes *fimH* e *papC*.

<i>fimH/papC</i>	Ciclos	
1) 95°C	1 min.	
2) 95°C	30 seg.	
3) 56,5°C	30 seg.	
4) 72°C	1 min.	2P - 35
5) 72°C	10 min.	
6) 4°C	pausa	

Tabela 12- Pesquisa do gene *ecpA*.

<i>ecpA</i>	Ciclos	
1) 95°C	3 min.	
2) 95°C	1 min.	
3) 51°C	1 min.	
4) 72°C	1 min.	2P - 30
5) 72°C	10 min.	
6) 4°C	pausa	

Tabela 3- Pesquisa do gene *usp*.

<i>usp</i>	Ciclos		
	1) 95°C	2 min.	
	2) 95°C	30 seg.	
	3) 58°C	30 seg.	
	4) 72°C	1 min.	2P - 30
	5) 72°C	10 min.	
	6) 4°C	pausa	

Tabela 4- Pesquisa do gene *hlyA*.

<i>hlyA</i>	Ciclos		
	1) 94°C	2 min.	
	2) 94°C	30 seg.	
	3) 51°C	30 seg.	
	4) 72°C	1 min.	2P - 30
	5) 72°C	10 min.	
	6) 4°C	pausa	

Tabela 5- Pesquisa do gene *cnf1*.

<i>cnf1</i>	Ciclos		
	1) 94°C	2 min.	
	2) 94°C	30 seg.	
	3) 51°C	30 seg.	
	4) 72°C	2 min.	2P - 35
	5) 72°C	10 min.	
	6) 4°C	pausa	

Tabela 6- Pesquisa das Ilhas de Patogenicidade PAI I_{CTF073} e PAI II_{CTF073}.

PAIs	Ciclos	
	1) 95°C	1 min.
	2) 95°C	30 seg.
	3) 57°C	30 seg.
	4) 72°C	1 min. 2P - 30
	5) 72°C	5 min.
	6) 4°C	pausa

Tabela 7- Determinação do grupo filogenético.

<i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e TspE4C2.1	Ciclos	
	1) 95°C	2 min.
	2) 95°C	30 seg.
	3) 55°C	30 seg.
	4) 72°C	1 min. 2P - 30
	5) 72°C	7 min.
	6) 4°C	pausa

Tabela 8- Determinação do *Sequence Type*.

MLST	Ciclos	
	1) 95°C	2 min.
	2) 95°C	30 seg.
	3) 50°C	30 seg.
	4) 72°C	1 min. 2P - 35
	5) 72°C	10 min.
	6) 4°C	pausa

Tabela 9- Pesquisa do gene *bla*_{CTX-M}.

<i>bla</i> _{CTX-M}	Ciclos	
1) 94°C	1 min.	
2) 94°C	45 seg.	
3) 53°C	45 seg.	
4) 72°C	40 seg.	2P - 25
5) 72°C	7 min.	
6) 4°C	pausa	

Tabela 10- Tipificação por M13-PCR *fingerprinting*.

M13-PCR <i>fingerprinting</i>	Ciclos	
1) 94°C	2 min	
2) 94°C	20 seg.	
3) 50°C	1 min.	
4) 72°C	20 seg.	2P - 35
5) 72°C	5 min.	
6) 4°C	pausa	

Tabela 11- Pesquisa do clone O25bST131.

O25bST131	Ciclos	
1) 94°C	4 min	
2) 94°C	30 seg.	
3) 53°C	30 seg.	
4) 72°C	1 min.	2P - 30
5) 72°C	5 min.	
6) 4°C	pausa	